

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

Ein spezifisches Nachweisverfahren für S-Nitrosothiole

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Marcel André Wiesweg
aus Essen
2013

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. M. Kirsch
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Poetsch
3. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. K. Becker, Giessen

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juni 2014

Publikation:

Wiesweg, M., Berchner-Pfannschmidt, U., Fandrey, J., Petrat, F., de Groot, H. und Kirsch, M. (2013):

Rocket fuel for the quantification of S-nitrosothiols.

Highly specific reduction of S-nitrosothiols to thiols by methylhydrazine.

Free Radical Res., 47 (2), 104-115.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	6
Stickstoffmonoxid.....	6
S-Nitrosothiole.....	6
Nachweisverfahren für S-Nitrosothiole.....	9
Die Inaktivierung freier Thiole.....	10
Der Nachweis entstandener Thiole.....	11
Die Reduktion von Nitrosothiolen.....	11
Methylhydrazin.....	13
Reaktion mit Nitrosothiolen.....	13
Oxidative Eigenschaften.....	13
Material und Methoden.....	15
Chemikalien.....	15
Synthese der niedermolekularen S-Nitroso-Verbindungen.....	15
Synthese des S-Nitrosoalbumin.....	15
Synthese des S-Nitrosopapain.....	16
Methoden.....	17
Spektrophotometrie.....	17
Quantifizierung von Thiolen und S-Nitrosothiolen.....	17
Reaktion des Methylhydrazins mit S-Nitrosothiolen.....	18
Histologische Präparate.....	19
Das Biotin Switch Assay.....	20
15N-Kernspinresonanzspektrometrie.....	20
Quantenchemische Berechnungen.....	21
Ergebnisse.....	22
Reaktion mit Disulfiden.....	22
Aufklärung des Reaktionsmechanismus.....	25
Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	27
Abbau von Thiolen.....	27
Quantifizierung des Einflusses von antioxidativen Zusätzen.....	30
Einfluss von einfallendem Licht und Reaktionstemperatur.....	30
Reduktion unter optimierten Bedingungen.....	31
Nachweisgrenze.....	31
Reduktion von S-Nitroso-Proteinen.....	31
Histologische Schnitte.....	36
Biotin Switch Assay.....	37

Diskussion.....	40
Eignung als Reduktionsmittel.....	40
Der Reaktionsmechanismus.....	41
Optimierte Reaktionsbedingungen.....	42
Die Reduktion von S-Nitrosothiolen in vitro.....	43
Histologische Schnitte.....	45
Die Biotin-Switch-Technik.....	46
Zusammenfassung.....	48
Literaturverzeichnis.....	49
Anhang.....	57
Abkürzungsverzeichnis.....	57
Danksagung.....	58
Lebenslauf.....	59

Einleitung

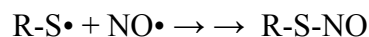
Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO•) ist einer der zentralen Botenstoffe des Organismus. Es ist beteiligt an der Regulation von Gefäßtonus und Blutdruck, Plättchenaggregation, Neurotransmission und der Erregerabwehr durch das Immunsystem. Endogen wird das Molekül durch die NO-Synthasen unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert. Es handelt sich chemisch um ein Radikal, das *in vivo* sehr schnell durch Reaktion mit molekularem Sauerstoff (Bunton et al. 1957), Superoxid (Blough et al. 1985), Häm (Palmer et al. 1987) oder Eisen (Lancaster et al. 1990) abgebaut wird. Seine Wirkung entfaltet NO• klassischerweise durch Bindung an die lösliche Guanylatzyklase, die, dadurch aktiviert, den Second Messenger cGMP produziert.

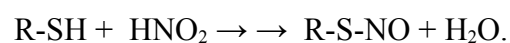
Als nach Anfang der Neunziger Jahre die enorme Bedeutung eines solch kurzlebigen Moleküls offenbar wurde, stellte sich die Frage, ob es möglicherweise langlebige Verbindungen gäbe, die der Speicherung oder dem Transport von NO• dienen könnten.

S-Nitrosothiole

Zum ersten Mal richtete sich der Fokus auf eine mögliche physiologische Rolle von S-Nitrosothiolen, kleinmolekularen oder proteinogenen Verbindungen, die sich durch die Nitrosierung ihrer Sulfhydrylgruppen, also die Reaktion von NO• mit R-SH unter Bildung von R-S-NO, auszeichnen:



Diese Verbindungen sind schon seit dem 19. Jahrhundert bekannt (Szaciłowski et al. 2001), ohne dass ihnen große Bedeutung beigemessen wurde. S-Nitrosothiole können *in vitro* leicht durch elektrophile Nitrosierung von Thiolen mit Donatoren von NO⁺ hergestellt werden, in wässriger Lösung typischerweise unter Einsatz von Nitrit, das bei saurem pH dann nitrosierende Spezies bildet wie z.B. N₂O₃ (Williams 2004):

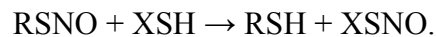


Abhängig von den Eigenschaften des eingesetzten Thiols bilden sich oft instabile Verbindungen, die nicht in Reinform isoliert werden können. Nur wenige Thiole ergeben langlebige Moleküle mit Halbwertszeiten von Stunden in wässriger Lösung. Durch solche Stabilität zeichnen sich vor allem das S-Nitrosoglutathion (GSNO) und das S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin (SNAP) aus, in gewissem Maße auch das S-Nitrosocystein.

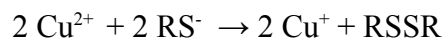
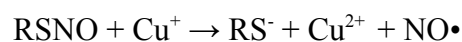
Alle Nitrosothiole zerfallen spontan entweder in einem langsamen thermischen Prozess, durch Strahlungseinwirkung (Szaciłowski et al. 2001) oder unter Katalyse von Metallionen zum entsprechenden Disulfid unter Freisetzung von NO•:



Zudem kann durch Transnitrosierung eine NO⁺-Gruppe zwischen Nitrosothiol und Thiol transferiert werden (Barnett et al. 1994):



Von Bedeutung ist die Zerfallsreaktion unter Katalyse von Kupfer, die um Größenordnungen schneller abläuft als der thermische Prozess. Physiologisch sind Cu²⁺ und Thiole zumindest in katalytischer Konzentration verfügbar, zweiwertiges Kupfer kann durch Oxidation von Thiolen in einwertiges Kupfer überführt werden. Es wurde ein entsprechender Zerfallsprozess unter Beteiligung von Cu⁺ beschrieben (Askew et al. 1995; Dicks et al. 1996):



Endogen vorhandene S-Nitrosothiole konnten im Plasma nachgewiesen werden: Das kleinmolekulare S-Nitrosoglutathion (Gaston et al. 1993), sowie die nitrosierten Proteine S-Nitrosoalbumin (Stamler, Jaraki, et al. 1992) und S-Nitrosohämoglobin (Jia et al. 1996).

Der Entstehungsweg der *in vivo* nachgewiesenen Nitrosothiole ist nicht vollständig aufgeklärt, aber es lässt sich zeigen, dass die Reaktanten Thiole, NO• und Sauerstoff bei physiologischem pH Nitrosothiole generieren. Postuliert wird die Mitwirkung

verschiedener Stickoxide wie NO₂ und N₂O₃ (Kharitonov et al. 1995).

Nitrosothiole zeigen experimentell die gleichen biologischen Eigenschaften bezüglich Vasodilatation, Hemmung der Plättchenaggregation oder Aktivierung der Guanylatzyklase wie NO•, pharmakokinetisch langsamer einsetzend, aber länger andauernd (Stamler, Simon, J. A. Osborne, et al. 1992; Butler et al. 1993). Eine Gleichgewichtseinstellung zwischen S-Nitrosothiolen und endogenen NO-Spiegeln in Anwesenheit freier SH-Gruppen als unspezifisches Transport- oder Speichermedium schien also naheliegend.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde aber ein weitreichenderer Zusammenhang aufgedeckt: Wurde der „Tissue-type“ Plasminogenaktivator (t-PA) an seiner einzelnen Sulfhydrylgruppe nitrosiert, entwickelte dieses Enzym, neben seiner bekannten Aktivität, der Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin in der Thrombolyse, zusätzlich vasodilatatorische Eigenschaften und hemmende Effekte auf Plättchenaggregation (Stamler, Simon, Jaraki, et al. 1992). Zum ersten Mal wurde hier, unabhängig vom Guanylatzyklase-Mechanismus, die S-Nitrosierung spezifischer freier SH-Gruppen eines Enzyms, die dann zur Aktivitätsänderung führt, als eine weitere Funktion des NO• diskutiert. Es handelt sich damit um eine posttranslationale Proteinmodifikation ähnlich etwa der schon lange bekannten Proteinphosphorylierung. Eine solche Funktion der S-Nitrosierung würde in ihrer biologischen Bedeutung weit über eine einfache, unspezifische Transport- und Speicherfunktion hinausreichen.

Ausgehend von dieser ersten Vermutung konnte in den folgenden 15 Jahren tatsächlich eine Vielzahl von Proteinen identifiziert werden, deren Funktion dynamisch posttranslational durch spezifische S-Nitrosierung reguliert wird. Damit wäre die lösliche Guanylatzyklase mit cGMP als Second Messenger nur einer unter vielen NO-regulierten Signalwegen. So zählen etwa der Ryanodin-Rezeptor des Herz- und des Skelettmuskels, der neuronale Glutamat-Rezeptor vom Typ NMDA, Proteinkinasen (Januskinase, Proteinkinase C, Src, EGF-Rezeptor), die Caspasen 1-8, der Transkriptionsfaktor NF-κB, oder das Onkoprotein p21 ras zu gut charakterisierten Zielen von S-nitrosierenden reaktiven Intermediaten. Die Gesamtheit der S-nitrosierten bzw. S-nitrosierbaren Proteine eines Organismus, das „S-Nitrosoproteom“ (López-

Sánchez et al. 2009), umfasst heute weit über 100 Proteine (Martínez-Ruiz et al. 2004; Hess et al. 2005; Stamler et al. 2001b). Das redox-basierte zelluläre Signalsystem wird, neben der Phosphorylierung, als eines der beiden großen, evolutionär stark konservierten Regulationssysteme angesehen (Stamler et al. 2001a).

Dabei stützt sich die überwiegende Anzahl dieser Ergebnisse für den Nachweis eines S-nitrosierten Proteins auf die sogenannte „Biotin-Switch Technique“.

Nachweisverfahren für S-Nitrosothiole

Der Nachweis von S-Nitrosothiolen in biologischen Proben trifft auf mehrere Schwierigkeiten: Die S-NO-Bindung ist relativ schwach und die Zugänglichkeit der S-NO-Gruppe wird durch Veränderungen der Proteinkonformation gesteuert. Zudem liegen die physiologischen Konzentrationen im unteren nanomolaren Bereich, damit an oder unter der Nachweisgrenze vieler etablierter Verfahren (Gow et al. 2007).

Nitrosothiole besitzen eine typische Absorptionsbande um 336 nm, mit einem Extinktionskoeffizienten in der Größe von etwa $1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – allerdings um Größenordnungen zu unempfindlich für die photometrische Analyse physiologischer Proben. Nur bei Untersuchungen zur Chemie der Nitrosothiole *in vitro*, wie unter anderem in dieser Arbeit, spielt die Photometrie als Nachweisverfahren eine durchaus bedeutsame Rolle.

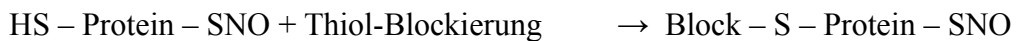
Angesichts des Fehlens direkter Nachweisverfahren basieren alle Techniken daher auf dem Aufbrechen der S-NO-Bindung in NO• und Thiol. Es ergeben sich zwei Gruppen: Solche Verfahren, die das freigesetzte NO• messen, und solche, die das entstandene Thiol nachweisen (Forrester et al. 2009).

Modell für die erste Gruppe ist das schon viele Jahrzehnte bekannte kolorimetrische Saville-Verfahren (Saville 1958), bei dem durch Quecksilberchlorid freigesetztes Nitrit zu einem Farbstoff reagiert. Es ist allerdings nicht für Konzentrationen deutlich unter 1 μM geeignet.

Die Messung von freigesetztem NO• kann höchst sensitiv durch Chemilumineszenz erfolgen, es stehen eine Reihe technisch weit entwickelter Verfahren zur Verfügung (Gow et al. 2007; Yang et al. 2003). Alle diese Verfahren sind aber prinzipiell nicht in

der Lage, das modifizierte Protein zu identifizieren, und können daher für die Untersuchung des „S-Nitrosoproteoms“ (López-Sánchez et al. 2009) nicht unmittelbar eingesetzt werden.

Ein entscheidender Fortschritt gelang mit der Entwicklung eines Nachweisverfahrens, das etablierte Gelelektrophorese- und Immunblottechniken mit einem spezifischen S-Nitrosothiol-Nachweis kombiniert: Die „Biotin Switch Technique“, kurz BST (Jaffrey et al. 2001). Dieses Verfahren besteht aus drei Schritten. Zunächst werden alle freien Sulfhydrylgruppen in der zu untersuchenden Probe inaktiviert. Anschließend werden vorhandene S-Nitrosothiole zu freien Thiolen reduziert, um dann im dritten Schritt ein Biotin-Molekül an die entstandenen Thiole zu koppeln:



Mit geeigneten Biotin-bindenden Antikörpern lassen sich die so gekennzeichneten Proteine beispielsweise in einem Western Blot nachweisen.

Die Inaktivierung freier Thiole

Die Konzentration freier Thiole liegt in biologischen Proben um Größenordnungen höher als die der S-Nitrosothiole. Die Konzentration von Thiolen im Plasma, hauptsächlich Albumine, liegt im Bereich von 450 μM (Jones et al. 2000). Damit ist klar, dass bei einem S-Nitrosothiolenachweis mit Hilfe generierter Thiole die nativen Thiole vorher praktisch vollständig geblockt werden müssen, um überhaupt verwertbare Resultate zu erhalten. Glücklicherweise stehen dafür mehrere Chemikalien zur Verfügung: Häufig eingesetzt wird S-Methylmethanthiosulfonat, MMST (Jaffrey et al. 2001), das, prinzipiell reversibel, Thiole zum Disulfid unter Anlagerung einer Methylgruppe oxidiert:



N-Ethylmaleinimid, NEM (Li et al. 2003) reagiert mit Thiolen unter praktisch irreversibler Bildung eines Thioethers:



Neben der Verfügbarkeit verschiedener Reagenzien für diesen ersten Schritt des Verfahrens ist es durch entsprechenden Versuchsaufbau mit Hilfe von Positiv- und Negativkontrollen ohne Weiteres möglich, eine ausreichende Inaktivierung der freien Thiole sicherzustellen (Gladwin et al. 2006).

Der Nachweis entstandener Thiole

In der klassischen Biotin Switch Technique wird an (entstehende) Thiole ein Biotin-Molekül angelagert. Dabei wird mit einem Pyridyldithiol als reaktiver Gruppe unter Abspaltung eines Pyridin-2-thions eine stabile Disulfidbindung zwischen dem zu markierenden Thiol und einem Abstandshalter-Molekül geschaffen, an dessen Ende das Biotin gebunden ist. Nach diesem Schritt wiederum ist das Protein für etablierte Nachweis- und Stofftrennungstechniken zugänglich, denn zur Bindung von Biotin stehen sowohl monoklonale Antikörper als auch das bakterielle Protein Streptavidin zur Verfügung.

Dieser dritte Schritt des Assays gilt als unkritisch, da zum einen Biotin-HPDP in Untersuchungen effizient und weitgehend vollständig reagierte (Zhang, Keszler, et al. 2005), zum anderen prinzipiell eine große Gruppe an unabhängigen Thiol-Nachweisverfahren eingesetzt werden kann (Ying et al. 2007; Wright et al. 1998).

Die Reduktion von Nitrosothiolen

Es ist daher der zweite Schritt des Biotin-Switch Assays, der über Spezifität und Sensitivität des Verfahrens entscheidet, denn für diesen Schritt steht bisher einzig Ascorbinsäure zur Verfügung. In einer Reihe von Veröffentlichungen wurde kritisch die Frage diskutiert, ob die auf Ascorbinsäure basierende Reduktion zufriedenstellende Ergebnisse liefert. Zwar konnte ein scheinbar ascorbinsäureabhängiger systematischer Fehler (Huang et al. 2006) später als vermeidbares Ergebnis einfallenden Tageslichts identifiziert werden (Forrester et al. 2007). Auch Behauptungen, Ascorbat reduziere Disulfidbindungen in Tubulin (Landino et al. 2006) oder dem Thiol-Reagenz 5,5-Dithio-bis(Nitrobenzoesäure) (Giustarini et al. 2008), wurden in einer Übersichtsarbeit als unplausibel zurückgewiesen (Forrester et al. 2009). Wiederholt und

unwidersprochen wurde allerdings in Frage gestellt, ob Ascorbinsäure Nitrosothiole mit ausreichender Ausbeute reduzieren kann. So zeigte ein direkter Vergleich mit einem Chemilumineszenzverfahren, dass die Ausbeute bei weitem nicht maximal ist (Zhang, Keszler, et al. 2005). Dieselben Autoren vermuten, Ascorbat erlaube nur „die Spitze des Eisbergs“ zu erkennen (Zhang und Hogg 2005). Ein Vorschlag, Kupfer(II)-Ionen zur Verbesserung der Ausbeute zuzusetzen (X. Wang et al. 2008), widerspricht Erkenntnissen, dass die Anwesenheit von Übergangsmetallen der Entstehung von Disulfiden Vorschub leistet, während gerade der Reaktionsweg zu freien Thiolen als Produkt die möglichst vollständige Entfernung von Kupfer verlangt (Askew et al. 1995; Dicks et al. 1996).

Zuletzt konnte gezeigt werden (Kirsch et al. 2009), dass die Reaktion von Ascorbat mit Nitrosothiolen Nitroxyl generiert, was wiederum zum Abbau von Sulfhydrylgruppen beiträgt. Eine vollständige Ausbeute war in dieser Arbeit nur unter speziellen Reaktionsbedingungen möglich, sehr hohem pH und Ausschluss von Sauerstoff, die beim Nachweis physiologischer Proben experimentelle Schwierigkeiten aufwerfen.

Im Licht dieser Erkenntnisse erscheint es wünschenswert, auch für den Reduktionsschritt der Biotin Switch Technique ein weiteres Reagenz zu finden, um die weitreichenden, bisher nur mit Hilfe von Ascorbat zusammengetragenen Ergebnisse bestätigen zu können.

Die Erfordernisse an einen solchen Stoff sind die der Spezifität und Sensitivität: Das ideale Reduktionsmittel würde einzig und allein mit Nitrosothiolen reagieren, und diese schnell und vollständig zu Thiolen umwandeln, ohne weiterer Oxidation der entstandenen Thiole Vorschub zu leisten. In der Praxis liegt die Schwierigkeit vor allem darin, dass nicht auch die ubiquitär vorhandenen Disulfide zu Thiolen reduziert werden dürfen. Es ist zum Beispiel sehr einfach, Nitrosothiole mit Dithiothreitol (DTT), einer reaktionsfreudigen Thiolverbindung, zu reduzieren, was auch sogar schon als Verbesserung der BST vorgeschlagen wurde (Kettenhofen et al. 2007). Für physiologische Proben wäre diese Methode allerdings unbrauchbar, da auch alle Disulfide reduziert und anschließend ein falsch-positives Signal erzeugt würde. Genauso ist Natriumsulfit (NaSO_3) in der Lage, S-Nitrosoglutathion schnell und mit

hoher Ausbeute zu reduzieren (Munro et al. 2000), reagiert aber ebenfalls mit Disulfiden.

Eine Reihe von sekundären Aminen und Stickstoffnukleophilen, unter anderem auch Hydrazin, reagiert zwar mit Nitrosothiolen (Munro et al. 1999), aber um Größenordnungen langsamer als Ascorbat (Forrester et al. 2009).

In dieser Arbeit wird der Einsatz der Chemikalie Methylhydrazin (Monomethylhydrazin, MMH) als Reduktionsmittel für Nitrosothiole untersucht.

Methylhydrazin

Methylhydrazin ist ein Derivat des Hydrazins, bei dem eines der beiden Stickstoffatome methyliert ist. Ähnlich wie die eng verwandten 1,1-Dimethylhydrazin und Hydrazin selbst wird dieser Stoff seit Jahrzehnten als Raketentreibstoff in Zweistoffsystemen eingesetzt, so etwa in den Landemodulen der Apollo-Mondmissionen, in bestimmten Triebwerken des Space Shuttles der NASA (Orbital Maneuvering System), oder in der Oberstufe der Ariane 5G-Rakete der Europäischen Weltraumagentur.

Reaktion mit Nitrosothiolen

Die Reaktion von Methylhydrazin mit S-Nitrosothiolen ist in der Literatur nicht beschrieben. Die Muttersubstanz Hydrazin wurde als Reduktionsmittel für eine Reihe organischer Substanzen wie Carbonyl- oder aromatische Nitro-Verbindungen untersucht. Lediglich in einer Veröffentlichung wurde berichtet, dass Hydrazin S-Nitrosopenicillamin abbauen kann (Munro et al. 1999).

Oxidative Eigenschaften

Bei den Hydrazinverbindungen handelt es sich – naheliegend bei dem geschilderten Einsatzzweck als Raketentreibstoff – um hochreaktive Verbindungen, die schon in Anwesenheit von Sauerstoff in einem recht langsamen Prozess unter Katalyse von Kupfer und anderen Spurenelementen eine Autooxidation zu Sauerstoff und Stickstoff zeigen. Es entsteht Wasserstoffperoxid (Gilbert 1929; Audrieth et al. 1951; Gaunt et al. 1966), auch freie Radikale wurden nachgewiesen (Ellis et al. 1960). Hydrazin wurde sogar kommerziell zur Entfernung von Sauerstoff in Wasserdampfanlagen eingesetzt

(Lurker 1976; MacNaughton et al. 1978).

Im Kontext eines Nachweisverfahrens für Thiole ist die Anwesenheit von Hydrazinen also potentiell nachteilig, denn Wasserstoffperoxid und andere unter dem Begriff „oxidativer Stress“ zusammengefasste Verbindungen führen zum Abbau von Thiolen (Winterbourn et al. 1999). Tatsächlich führte Hydrazin in Zellkulturexperimenten zum Abbau des zellulären Glutathion-Pools unter Zunahme des oxidierten Glutathions und der Lipidperoxidation (Hussain et al. 2002). Die Induktion chromosomaler Schäden konnte durch Zugabe von Cystein abgeschwächt werden (Speit et al. 1980). Das karzinogene Potenzial des Moleküls konnte unter anderem auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Alkylradikale zurückgeführt werden (Gamberini et al. 1998).

Die mögliche Auswirkung einer sekundären Oxidation der entstandenen Thiole auf die Ausbeute der Reaktion wird also bedacht werden müssen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob Methylhydrazin trotz der zu erwartenden Hindernisse die Anforderungen an ein spezifisches Reduktionsmittel für Nitrosothiole erfüllt und in den etablierten Nachweisverfahren anstelle von Ascorbinsäure und in überlegener Wirksamkeit eingesetzt werden kann.

Material und Methoden

Chemikalien

Sigma, Taufkirchen	Ascorbinsäure, Serumalbumin (vom Rind, BSA), Cystamin-Dihydrochlorid, 5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), EDTA, Glutathion (GSH), Methylhydrazin (MMH), Naphthylethyldiamin-Dichlorid, N-Ethylmaleimid (NEM), Natriumsulfit, Papain, Triethanolamin (TEA), 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox), Sulfanilamid, ¹⁵ N-markiertes Hydrazin
Merck, Darmstadt	Natriumnitrit (NaNO ₂)
Invitrogen, Karlsruhe	Bodipy FL L-Cystin,
Fisher Scientific, Schwerte	DyLight 549 Maleimid, Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)
Roche Diagnostics, Mannheim	Katalase (Rinderleber, EC 1.11.1.6)

Alle Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Alle anderen Chemikalien waren von der höchsten kommerziell erhältlichen Reinheit.

Synthese der niedermolekularen S-Nitroso-Verbindungen

S-Nitrosoglutathion (GSNO), S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin (SNAP), und N-Acetyl-N-nitrosotryptophan (NANT) wurden wie vorbeschrieben hergestellt (Sonnenschein et al. 2004).

Synthese des S-Nitrosoalbumin

Für die Herstellung von S-Nitrosoalbumin wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. In Anlehnung an die von Marley beschriebene Methode (Marley et al. 2001) wurde eine 2 mM Albuminlösung zunächst für 72 h mit TCEP (1 mM) inkubiert, um die je nach Präparation unterschiedlich stark oxidierte SH-Gruppe des Albumins möglichst

vollständig verfügbar zu machen. Zu 1 ml dieser Lösung erfolgte dann die Zugabe von 200 µl Phosphatpuffer (1 M, pH 7,9), 10 µl EDTA (100 mM) und 200 µl GSNO (100 mM), um durch Transnitrosierung zwischen GSNO und Albumin das S-Nitrosoalbumin zu erzeugen. Nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde bei 37 °C erfolgte zur Inaktivierung eventuell nicht reagierter Thiole die Zugabe von 200 µl NEM (100 mM) für 1 Stunde. Anschließend wurde die Lösung gegen Phosphatpuffer (pH 7,4, 0,9% NaCl, 100 µM EDTA) über 24 h unter beständiger Durchmischung bei 5 °C dialysiert (zwei Mal für je 1 h mit 1 l Puffer, dann mit 3 l für 22 h). Das Produkt wurde bei -20 °C gelagert, die Konzentrationsbestimmung des erzeugten S-Nitroso-Albumins erfolgte vor Gebrauch mit Hilfe des Saville-Verfahrens.

Alternativ wurde S-Nitrosoalbumin in leichter Abwandlung der von Noble und Williams entwickelten Methode hergestellt (Noble et al. 2001). Dabei wurden 66.4 mg Albumin vorsichtig in destilliertem, EDTA enthaltendem Wasser gelöst, die Lösung auf 1 °C gekühlt und HCl (1M) hinzugegeben, so dass sich Konzentrationen von 1 mM Albumin, 400 mM HCl und 500 µM EDTA ergaben. Die Konzentration an freien Thiolen der jeweiligen Albuminpräparation war durch Messung vorbekannt. NaNO₂ (20 mM, 1 °C) wurde in entsprechender Konzentration hinzugegeben und die Lösung auf Eis für eine Stunde inkubiert. Danach erfolgte durch Titration mit NaOH (1M) und Zugabe von TEA-Puffer (500 mM, pH 8,7, 500µM EDTA) die Einstellung eines pH-Werts von 8,7. Das Produkt wurde sofort verwendet und nicht gelagert.

Synthese des S-Nitrosopapain

Die Herstellung von S-Nitrosopapain erfolgte analog zur zuletzt beschriebenen Technik, nur wurde hierbei das Protein in 200 mM HCl mit 0.9% NaCl und 200 µM EDTA gelöst, und die NaNO₂-Konzentration lag bei 400 µM. Die erhaltene Lösung wurde auf einen pH-Wert von 9,5 gebracht, da sie im pH-Bereich zwischen 7,0 und 9,4 lichtundurchlässig und somit unbrauchbar wurde. In einer alternativen Herstellungsmethode wurden 23 mg Papain in Phosphatpuffer (75 mM, pH 2,7, 200 µM EDTA) gelöst, die Lösung mit HCl (1M) auf einen pH-Wert von 2,7 titriert, auf 1 °C gekühlt und dann NaNO₂ (2 M) hinzugefügt. Nach einer Inkubationsdauer von 45 Minuten erfolgte die Verdünnung mit TEA-Puffer (100 mM, pH 8,7, 500 µM EDTA) im

Verhältnis 1:4 und erneute Einstellung des pH auf 8,7 mit NaOH (1M). Beide Präparationen wurden sofort verwendet.

Methoden

Spektrophotometrie

Die spektrophotometrischen Analysen wurden mit einem SPECTROCORD S-100 Dioden-Array-Spektrophotometer (Analytik Jena, Jena) durchgeführt, das mit einer Vorrichtung zur Temperierung der Küvette ausgerüstet war. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten die Messungen bei 22 °C.

Quantifizierung von Thiolen und S-Nitrosothiolen

Zur Konzentrationsbestimmung der Thiolgruppe im mikromolaren Bereich wurde das Verfahren nach Ellman eingesetzt (Ellman 1958). Zunächst wurde eine 30 mM DTNB-Stammlösung in Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,0, 100 µM EDTA, 25 °C) hergestellt. Die Proben wurden mit demselben Puffer verdünnt. Zu 1 ml verdünnter Probe wurden 10 µl der DTNB-Stammlösung gegeben. Nach Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Konzentration des entstandenen p-Nitrothiophenol-Anions photometrisch bestimmt ($\epsilon = 14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 412 nm gegen Nullwert (Eyer et al. 2003)). Bei allen Proben mit proteingebundenem Thiol wurde bei der Inkubation Cystamin hinzugefügt, um auch sterisch dem DTNB nicht zugängliche SH-Gruppen erreichen zu können (Riener et al. 2002; Faulstich et al. 1993; Wright et al. 1998). Die notwendige Inkubationszeit wurde für jede unterschiedliche Art von Probe in Kontrollexperimenten bestimmt, um sicher zu gehen, dass die Reaktion weitgehend komplett erfolgt und ein stabiler Extinktionswert erreicht war.

Thiolkonzentrationen im nanomolaren Bereich wurden fluoreszenzbasiert mit Hilfe von Bodipy FL L-Cystin bestimmt. Eine 1 mM Stammlösung wurde durch Lösen von 1 mg Bodipy FL L-Cystin in 1,26 ml Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,9) hergestellt, bei -20 °C gelagert und unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut. Die Proben wurden mit TEA-Puffer (100 mM, pH 8,7, 500 µM EDTA) bis zu einem Volumen von 780 µl verdünnt und 20 µl der Bodipy-Stammlösung hinzugegeben (Endkonzentration 5 µM). Dabei sollte die

erwartete Thiolkonzentration zwischen 5 nM und 2 μ M liegen. Die Proben wurden in verdunkelten Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur im Dunkeln für 24 oder 48 Stunden inkubiert, dann die Fluoreszenz ($\lambda_{em} = 511$ nm, $\lambda_{ex} = 504$ nm) gemessen. Bei allen Proben mit proteingebundenem Thiol wurde auch hier, wie oben beschrieben, bei der Inkubation Cystamin (5 μ M) zugesetzt (R. Singh et al. 1993).

Die Konzentrationsbestimmung von S-Nitroso-Verbindungen erfolgte mit dem Saville-Verfahren (Saville 1958).

Reaktion des Methylhydrazins mit S-Nitrosothiolen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Versuche in verdunkelten Reaktionsgefäßen bei 22 °C durchgeführt. Als Ausnahme wurden einige Proben zur Untersuchung des Effekts einfallenden Tageslichts in normalen, transparenten Gefäßen auf einer Fensterbank im Tageslicht inkubiert. Reaktionspuffer war ein TEA-Puffer (100 mM, pH 8.7, 500 μ M EDTA). Zudem enthielt die optimierte Reaktionslösung 400 μ M Trolox und 1300 U/l Katalase. Die S-Nitrosoverbindung wurde der Reaktionslösung hinzugegeben, der pH durch Zugabe von HCl (1 M) oder NaOH (1 M) wieder auf 8.7 eingestellt, und die Lösung, falls benötigt, ins Photometer überführt. Anschließend wurde durch Zugabe von Methylhydrazin (Stammlösung 100 mM, Endkonzentration 10 mM, unmittelbar vor Gebrauch in TEA-Puffer gelöst) gestartet. In Kontrollen wurden das Methylhydrazin oder die S-Nitroso-Verbindung weggelassen, oder Ascorbinsäure (10 mM in Phosphatpuffer, pH 7,9) anstatt Methylhydrazin verwendet.

Bei kinetischen Messungen des Abbaus der S-Nitroso-Gruppe wurde das Extinktionsband bei 340 nm spektrophotometrisch unter Verwendung folgender Extinktionskoeffizienten analysiert:

<i>Stoff</i>	GSNO	SNAP	S-Nitrosoalbumin
<i>Absorptions-maximum</i>	336 nm	340 nm	334 nm
<i>Extinktions-koeffizient</i>	922 M ⁻¹ cm ⁻¹	1042 M ⁻¹ cm ⁻¹	870 M ⁻¹ cm ⁻¹
<i>Literatur</i>	(Smith et al. 2000)	(Aguar et al. 2005)	(Meyer et al. 1994)

Zur Bestimmung der entstandenen Thiole wurden direkt vor und direkt nach Zugabe von Methylhydrazin und danach in regelmäßigen Intervallen Proben entnommen.

Eichgeraden zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen von GSNO und Albumin, Durchführung der Reaktion mit Methylhydrazin und anschließender Bestimmung der Thiolkonzentration, wie oben beschrieben mit DTNB oder Bodipy FL L-Cystin, gewonnen.

Histologische Präparate

Paraffinschnitte von 3 μM Schnittdicke des Jejunums gesunder männlicher Wistar-Mäuse wurden in Xylol entparaffinisiert, in 100%, 95% und 70% Ethanol hydriert und mit destilliertem Wasser gewaschen.

Gemäß den Angaben im Ergebnisteil wurden die Schnitte in folgenden Einzelschritten behandelt:

- 1) Dithiothreitol (50 mM in Phosphatpuffer, 100 mM, pH 7,5, 200 μM EDTA) für 30 min
- 2) N-Acetyl-N-nitrosotryptophan (5 mM, gelöst in DMSO und dann mit Phosphatpuffer verdünnt) für 30 min
- 3) N-Ethylmaleimid (50 mM in Phosphatpuffer) für 30 min
- 4) Methylhydrazin (mit Katalase und Trolox, wie oben beschrieben) für 45 min
- 5) DyLight 549 Maleimid-Farbstoff (75 μM in Phosphatpuffer, 100 mM, pH 7,5, 200 μM EDTA; der Farbstoff wurde unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, in Puffer gelöst und die gewünschte Konzentration photometrisch nach dem vom Hersteller angegebenen Extinktionskoeffizienten eingestellt)

Zwischen allen Schritten und nach der Färbung wurden die Schnitte drei Mal mit Phosphatpuffer gründlich gewaschen. Da durch Einschluss mehrerer Kontrollen nicht alle Schnitte allen fünf Arbeitsschritten unterzogen wurden, mussten die Anfangszeiten der Deparaffinisierung und die Einzelschritte zeitlich so angeordnet werden, dass für jeden Schnitt nach Möglichkeit Wartezeiten vermieden werden konnten. Nach der

Färbung wurden die Schnitte mit feuchtem Einbettungsmedium und Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte unter einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510; Zeiss, Oberkochen) unter Benutzung des Helium/Neon-Lasers bei 543 nm. Mindestens zwei Gesichtsfelder wurden pro Schnitt fotografiert und die mittlere Fluoreszenz aus dem Mittel der Helligkeitswerte im Histogramm oberhalb der Grundfluoreszenz einer gewebefreien Region berechnet.

Das Biotin Switch Assay

Zur Durchführung des Biotin Switch Assays wurden drei verschiedene Proteine vorbereitet: In oben beschriebener Technik hergestelltes S-Nitroso-Albumin, natives Serumalbumin mit einem Anteil freier SH-Gruppen von 37% in der eingesetzten Charge, sowie natives Serumalbumin, dessen SH-Gruppen durch Behandlung mit NEM, gefolgt von gründlicher Dialyse, inaktiviert wurden.

Das Assay wurde exakt wie beschrieben (Forrester et al. 2007) ausgeführt, nur dass anstatt Ascorbinsäure bei einigen Proben Methylhydrazin als Reduktionsmittel eingesetzt wurde. Für diese Proben erfolgte der kombinierte Reduktions- und Markierungsschritt in TEA-Puffer (o.g. Reaktionslösung aus Methylhydrazin, Katalase und Trolox). Für Ascorbinsäure wurden die etablierten Puffer und pH-Werte benutzt, also ein „HEN“-Puffer (HEPES 250 mM, EDTA 1 mM, Neocuproin 0,1 mM, pH 7,7). Die biotinylierten Proteine wurden in einem Western Blot unter Verwendung von Anti-Biotin von der Maus als Primärantikörper und Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Anti-Maus-Antikörper von der Ziege als Sekundärantikörper dargestellt. Ein ECL Western Blotting System der Firma Amersham wurde zum Nachweis eingesetzt.

¹⁵N-Kernspinresonanzspektrometrie

¹⁵N-angereichertes (98,5%) Hydrazin ($\text{H}_2^{15}\text{N}^{15}\text{NH}_2$, 400 mM) wurde mit 200 mM von entweder ¹⁵N-markiertem GSNO oder GSNO mit natürlichem Gehalt an ¹⁵N (0,37%) in o.g. Reaktionslösung mit TEA-Puffer, Katalase und Trolox 24h bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Entnommene Proben wurden mit 10% D₂O versetzt und die entstandenen Produkte mit 50,67 MHz ¹⁵N-NMR-Spektroskopie in einem Bruker ADVANCE DRX 500-Instrument identifiziert. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind

in der Einheit „parts per million“, ppm, relativ zu Nitromethan ($\delta = 0$) als externem Standard angegeben.

Quantenchemische Berechnungen

Quantenchemische Berechnungen auf der Ebene von Complete Basis Set CBS-QB3 (Montgomery et al. 2000) wurden mit der Software Gaussian 03 (Revision A.11.3) durchgeführt. Lösungsenthalpien wurden in optimierter Gasphasengeometrie mit der in die genannte Software integrierten CPCM-Methode evaluiert (Barone et al. 1997). Es ist bekannt, dass mit beiden Methoden, CBS-QB3 und CPCM / (U)HF/6-31(+)G(d), Ergebnisse im Bereich der „chemischen Genauigkeit“, $\pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$, erzielt werden können.

Ergebnisse

Reaktion mit Disulfiden

Dithiothreitol, Glutathion, Natriumsulfit und TCEP sind vier Stoffe, die in der Lage sind S-Nitrosothiole zu reduzieren, aber nicht die geforderte Spezifität gegenüber Disulfiden aufweisen. Demgegenüber wird gefordert, dass Methylhydrazin und Ascorbinsäure Disulfide nicht reduzieren. Um dies zu überprüfen, wurden 1) Nur Cystamin als Kontrolle, 2) Methylhydrazin, 3) Ascorbinsäure, 4) Ascorbinsäure mit Cu^{2+} , 5) Ascorbinsäure mit Cu^{1+} , 6) Glutathion, 7) Dithiothreitol, 8) Natriumsulfit, oder 9) TCEP, mit Bodipy FL L-Cystin als Indikatormolekül inkubiert. Bei Messung der nur nach Spaltung der Cystin-Disulfidbrücke auftretenden Fluoreszenz zeigte sich, dass sowohl Methylhydrazin als auch Ascorbinsäure zu keinem Anstieg über den Kontrollwert führen, während die erstgenannte Gruppe ein deutlich positives Signal erzeugt und somit die Disulfid-Brücke reduzierte (Bild 1a).

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde die Reaktion von Methylhydrazin und oxidiertem Glutathion (GSSG) untersucht. Es kam zu keinem Nachweis entstandener Thiole mit Hilfe des DTNB-Tests, selbst bei Einsatz einer hohen GSSG-Konzentration von 500 μM (Bild 1b). Kontrollen schlossen unspezifische Reaktionen zwischen DTNB, Methylhydrazin und / oder reduziertem Glutathion (GSH) aus.

Bei der Reaktion mit GSNO bestätigte sich die Fähigkeit von Methylhydrazin zur Reduktion des Nitrosothiols zum Thiol, es wurden während einer Stunde ca. 335 μM generiert. Bei Einsatz von Ascorbat war die Ausbeute mit ca. 450 μM jedoch höher. Die Anwesenheit von Kupferionen (10 μM), einwertig oder zweiwertig, verminderte das Ergebnis deutlich (220 μM).

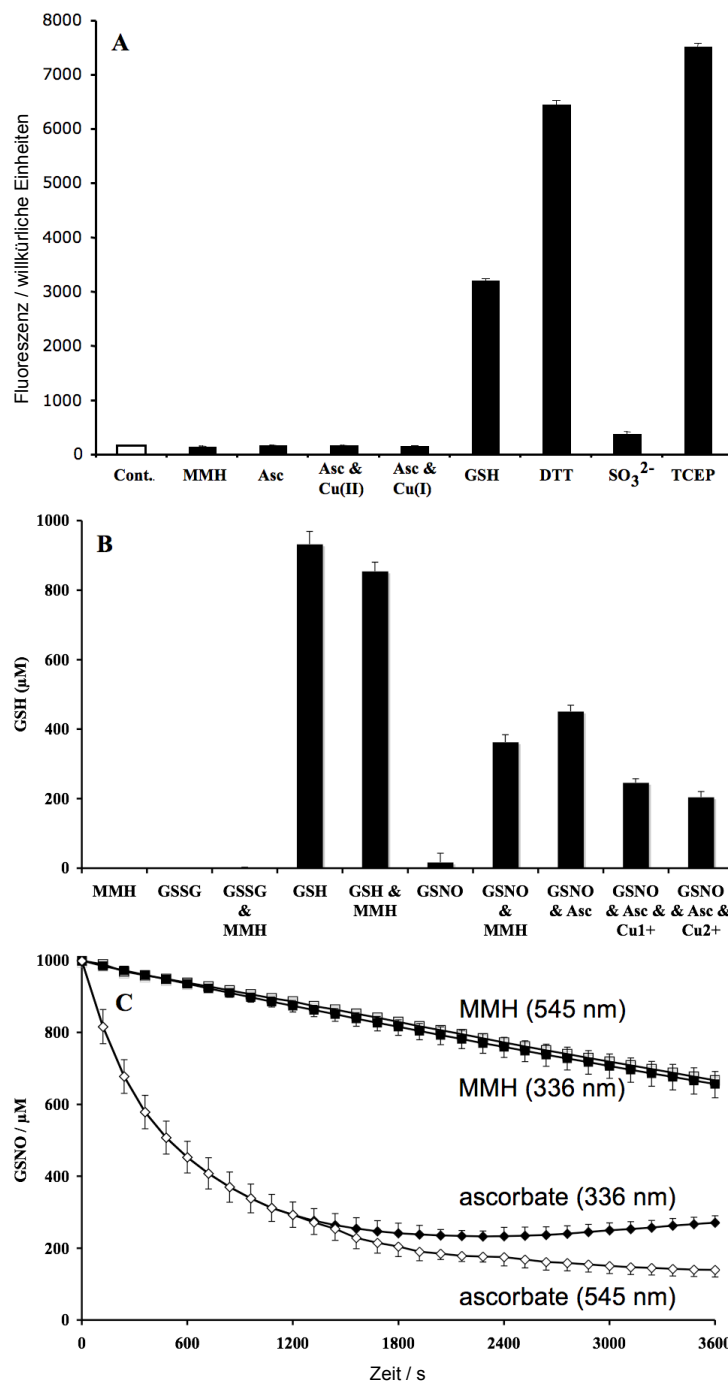


Bild 1: Eigenschaften von Methylhydrazin als Reduktionsmittel.

Reaktionspuffer: TEA (100 mM, pH 8,7, EDTA 500 μM, Trolox 400 μM, Katalase 1300 U/l).

(A) Reaktion mit Bodipy FL L-Cystin: Cystamin 5 μM (Kontrolle), Methylhydrazin (MMH) oder Ascorbinsäure (Asc), je 10 mM, GSH, DTT, Natriumsulfit oder TCEP je 10 μM, Cu(I) und Cu(II) je 10 μM und unter Verzicht auf EDTA. Reaktionsstart durch Zugabe von Bodipy FL-Cystin, Messung der Fluoreszenz nach 48h.

(B) Reaktionsstart durch Hinzugabe von MMH (10 mM) zu GSNO (1 mM), GSH (1 mM) oder GSSG (500 μM). Messung der Thiolkonzentration nach 1h mittels DTNB.

(C) Reduktion von GSNO (1 mM) durch Ascorbinsäure oder MMH (je 10 mM).

Spektrophotometrische Darstellung bei 335 nm (1cm-Küvette) bzw. 545 nm (10cm-Küvette)

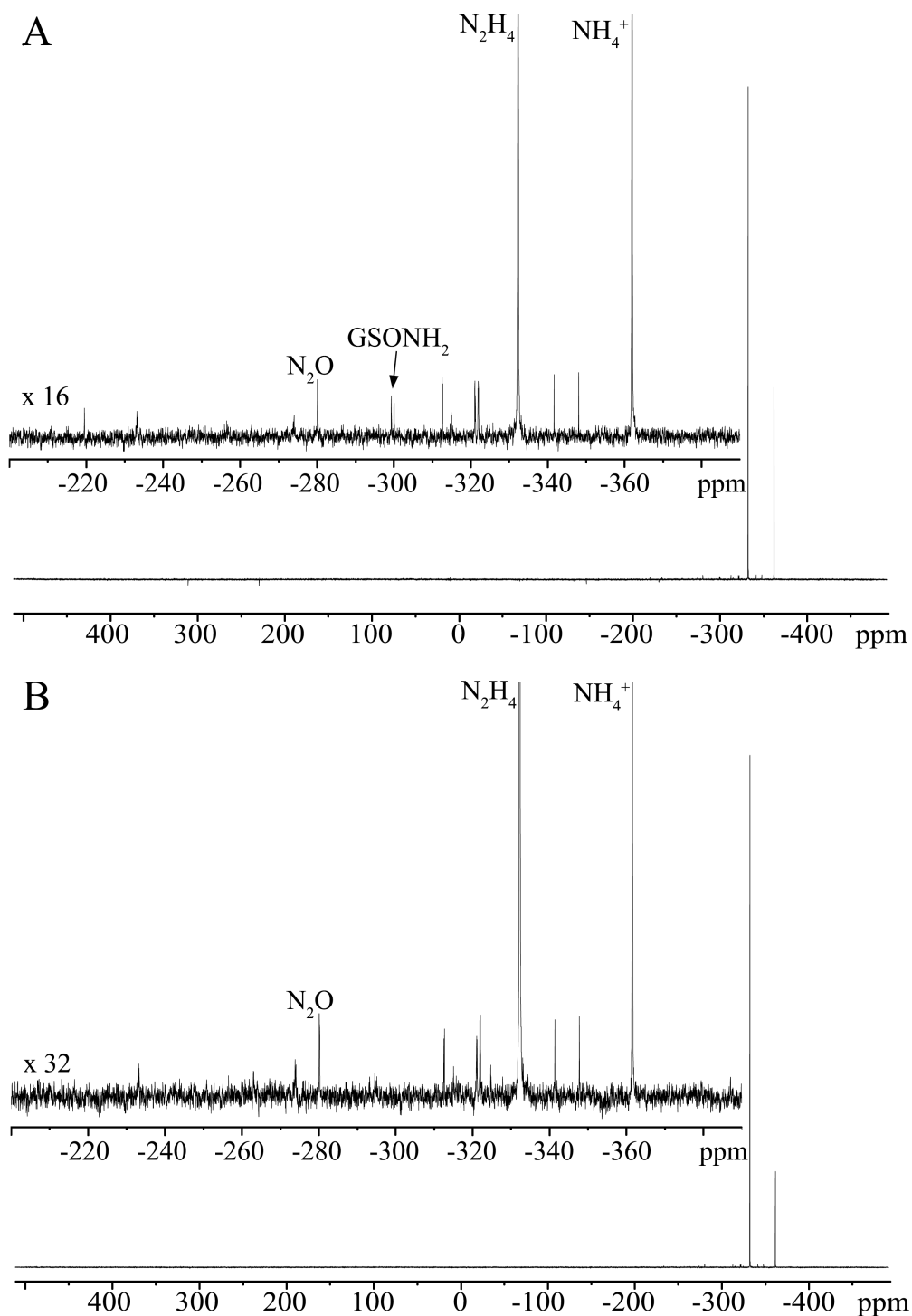


Bild 2: ^{15}N -NMR-Spektroskopie der Reaktionsprodukte.

Endprodukte der Reaktion von ^{15}N -angereichertem (98,5%)

Hydrazin ($\text{H}_2^{15}\text{N}^{15}\text{NH}_2$, 400 mM) mit

(A) ^{15}N -markiertem (99,2%) *S*-Nitrosoglutathion (GS^{15}NO) oder

(B) *S*-Nitrosoglutathion mit natürlichem Gehalt an ^{15}N (0,37%)

in TEA-Puffer (100 mM, pH 8,7, EDTA 500 μM , Trolox 400 μM , Katalase 1300 U/l).

^{15}N -NMR-spektroskopische Messung nach 24h Inkubation bei Raumtemperatur.

Zur weiteren Abklärung des scheinbar schlechteren Reduktionsergebnisses unter Einsatz von Methylhydrazin anstatt Ascorbinsäure wurden diese beiden Reaktionen in ihrem Verlauf photometrisch charakterisiert. Da Oxidationsprodukte der Ascorbinsäure Licht im Bereich von 330 nm absorbieren und daher die Absorptionsbande von GSNO bei 336 nm nicht nutzbar war, wurde der zweite charakteristische Bereich bei 545 nm gemessen. Nach einer einstündigen Reaktionszeit war durch die Ascorbinsäure 860 μM des GSNO umgesetzt, so dass die Ausbeute 52% (450 μM entstandenes GSH / 860 μM verbrauchtes GSNO) betrug. Mit Methylhydrazin waren nur 350 μM umgesetzt, so dass eine Ausbeute von 95% (335 μM entstandenes GSH / 350 μM verbrauchtes GSNO) vorlag (Bild 1c).

Aufklärung des Reaktionsmechanismus

Die NMR-spektrometrischen Ergebnisse der Reaktion von GS^{15}NO (98% ^{15}N) mit $\text{H}_2^{15}\text{N}^{15}\text{NH}_2$ (98,5% ^{15}N) sind in Bild 2a dargestellt. Neben der Ausgangssubstanz Hydrazin (H_2N_4) wurden insbesondere Ammoniak (NH_4^+) und Distickstoffmonoxid (N_2O) als Reaktionsprodukte identifiziert, zudem einige Nebenprodukte in der Aminregion (-300 bis -340 ppm). Eine Kernresonanz konnte dem Sulfinamid des GSNO ($\text{GS}(\text{O})^{15}\text{NH}_2$) zugeordnet werden und war nicht detektierbar, wenn die Reaktion mit GSNO mit natürlicher Verteilung der Stickstoffisotope (0,37% ^{15}N) durchgeführt wurde (Bild 2b). Bemerkenswerterweise ließen sich weder Stickstoff (+70 ppm) noch Nitrit (+229 ppm) als erwartete Endprodukte einer primären Reduktionsreaktion nachweisen.

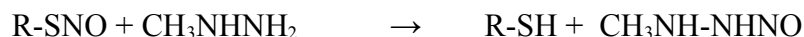
Die ^{15}N -NMR-Ergebnisse legen nun den Schluss nahe, dass mit Hydrazin als Substrat das kurzlebige Intermediat H_2NNHNO gebildet wird,



welches die erwarteten Produkte Ammoniak und Lachgas abspaltet



Mit Methylhydrazin als Substrat sollte nun das entsprechende Intermediat $\text{CH}_3\text{NH-NHNO}$ gebildet werden:



Um nun sicherzustellen, dass ein solch instabiles Intermediat gebildet werden kann, führten wir zudem quantenchemische Berechnungen auf der Basis von CBS-QB3 für die Reaktion von S-Nitrosocystein als Modell für proteingebundene S-Nitrosothiole mit Methylhydrazin durch:



Es ergab sich auch in wässriger Lösung eine exergone Reaktion (Tabelle 1).

$\Delta_R G_{\text{gas}}$	– 8,4 kcal/mol
$\Delta_R G_{\text{solv}}$	– 4,0 kcal/mol
$\Delta_R G_{\text{total}}$	– 12,4 kcal/mol

Tabelle 1: Quantenchemische Berechnung der Änderung der Gibbs-Energie der Reaktion von S-Nitrosocystein mit Methylhydrazin

Die Rechnungen auf hohem theoretischen Niveau erlauben nun den Schluss, dass die gefundene Nachweisreaktion (Gleichung 1) thermodynamisch erlaubt ist.

Zur Bestimmung der Reaktionskinetik wurde die Reaktion von GSNO und Methylhydrazin bei vier verschiedenen Temperaturen zwischen 22 °C und 55 °C durch Messung der Extinktion bei 336 nm untersucht, die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten gegen 1/T aufgetragen und Steigung und Achsenabschnitt durch lineare Regression berechnet. Es ergab sich eine Reaktionskinetik erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von 2:20 h bei Raumtemperatur. Die Halbwertszeiten bei vier verschiedenen Temperaturen wurden bestimmt und in einem Arrheniusgraph dargestellt. Daraus wurden die Reaktionskonstante erster Ordnung und die Aktivierungsenergie berechnet (Tabelle 2).

T / K	k / 10 ⁻⁵ s ⁻¹ bei 295 K	A / 10 ⁷ s ⁻¹	E / kJ mol ⁻¹
295 - 328	8.25 ± 0.49	1.64 ± 0.15	63.7 ± 0.3

Tabelle 2: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Reaktion von Methylhydrazin und S-Nitrosoglutathion

Optimierung der Reaktionsbedingungen

Abbau von Thiolen

Wie schon erläutert, sind Hydrazine hochreaktive Verbindungen, die in Anwesenheit von Sauerstoff Autooxidation zeigen und reaktive Sauerstoffspezies generieren. Die praktische Bedeutung dieses Effekts wurde untersucht, indem Glutathion (250 μ M) mit Methylhydrazin für 2 h inkubiert wurde. Gemäß Bestimmung mit DTNB wurde die Thiolgruppe des GSH in Anwesenheit von Methylhydrazin im Vergleich zur Kontrolle um $41\% \pm 2\%$ oxidiert (Bild 3). Das Durchführen der Reaktion unter anaeroben Bedingungen (Stickstoffatmosphäre) oder die Zugabe von Katalase hatten jeweils einen deutlichen protektiven Effekt.

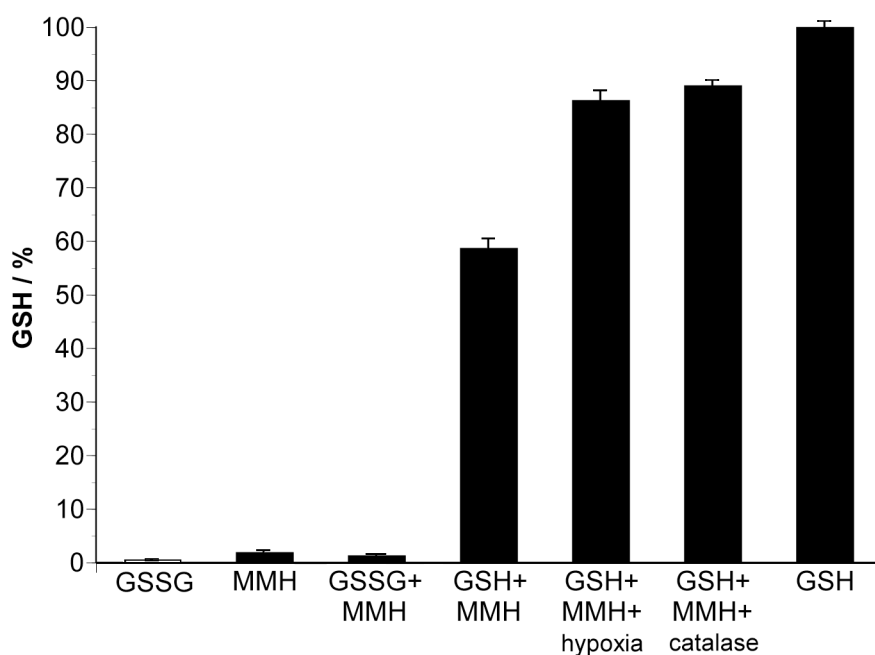


Bild 3: Auswirkung der Anwesenheit von Methylhydrazin auf die GSH-Konzentration. Inkubation von GSH oder Kontrolle (GSSG), je 250 μ M, mit Methylhydrazin (MMH, 10 mM) in TEA-Puffer (100 mM, pH 8,7, EDTA 500 μ M, Trolox 400 μ M, Katalase 1300 U/l). Messung der GSH-Konzentration mit DTNB nach 1h, Angaben relativ zur Positivkontrolle.

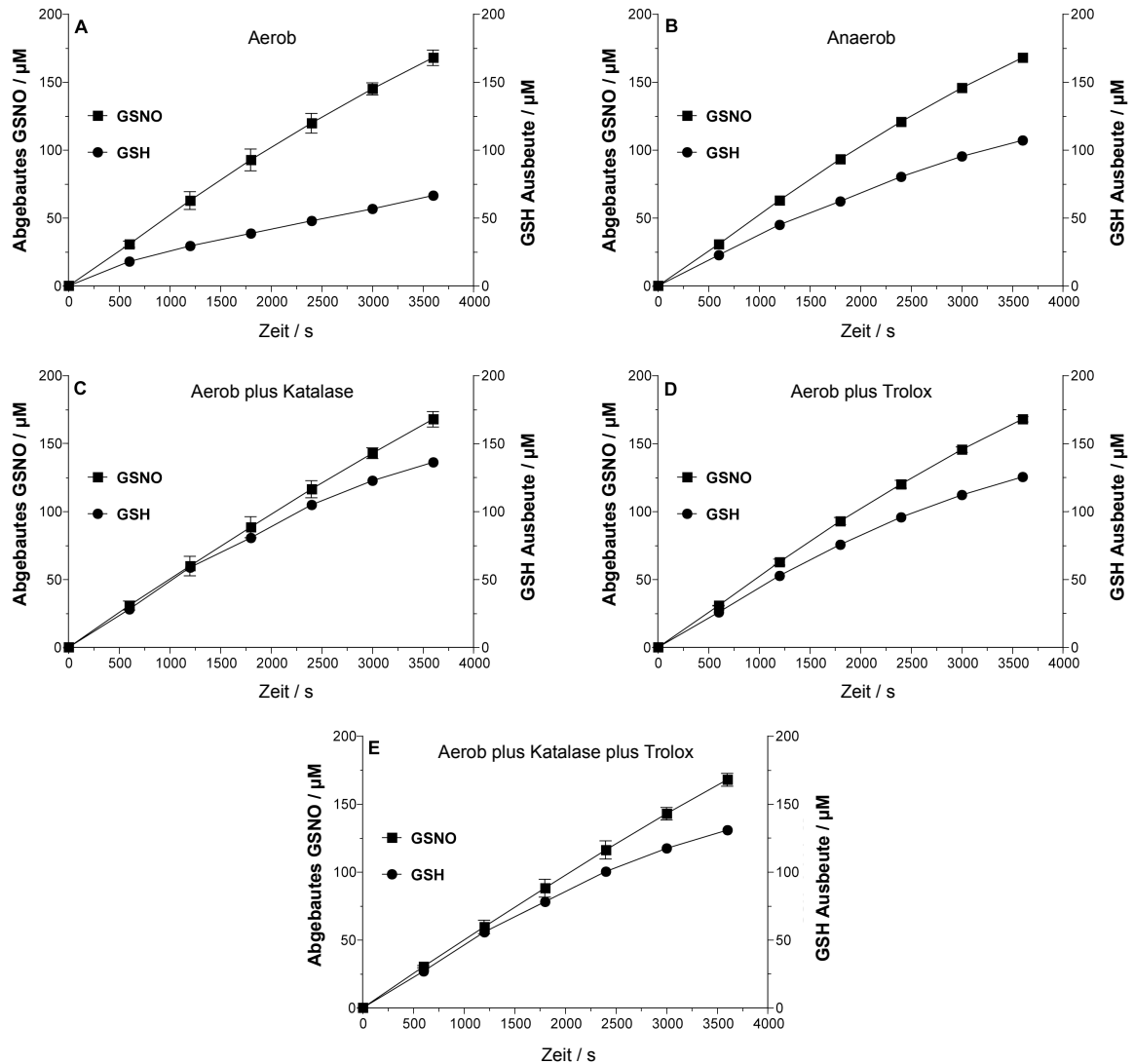


Bild 4: Einfluss von antioxidativen Zusätzen auf die Reaktionsausbeute. Reaktion von GSNO (1 mM) mit Methylhydrazin (10 mM) in TEA-Puffer (100 mM, pH 8,7, EDTA 500 µM). Je gleichzeitige Messung und Darstellung des GSNO-Abbaus (■, spektrophotometrisch gemessen) und Ausbeute an Thiolen (●, DTNB-Testverfahren) über die Zeit.

(A) Aerob,

(B) Anaerob,

(C) Aerob mit Zusatz von Katalase 1300 U/l,

(D) Aerob mit Zusatz von Trolox 400 µM,

(E) Aerob mit Zusatz von Trolox 400 µM und Katalase 1300 U/l.

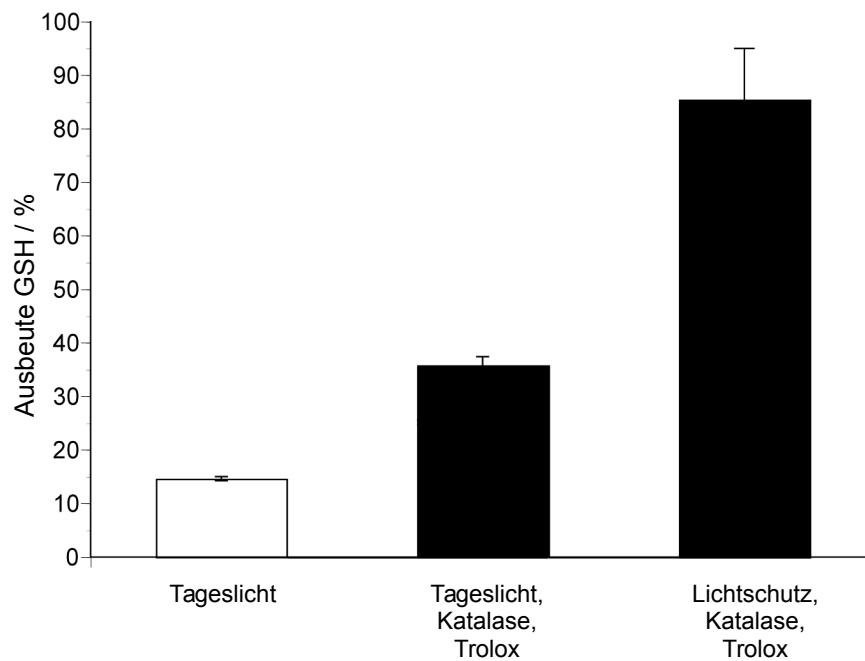


Bild 5: Effekt einfallenden Tageslichtes.

Reaktion von GSNO (200 μ M) mit Methylhydrazin (10 mM) in TEA-Puffer (100 mM, pH 8,7, EDTA 500 μ M, Trolox 400 μ M, Katalase 1300 U/l).

Messung der GSH-Konzentration mit DTNB und der GSNO-Konzentration spektrophotometrisch nach 2h, Angabe der Reaktionsausbeute relativ zum abgebauten GSNO.

Quantifizierung des Einflusses von antioxidativen Zusätzen

Um den Einfluss der zur Verfügung stehenden Zusätze zu bewerten, wurde die Reaktion von GSNO (1 mM) und Methylhydrazin in ihrem zeitlichen Verlauf genauer untersucht. In regelmäßigen Intervallen wurde das abgebaute GSNO durch Messung der Extinktion bei 336 nm und das entstandene Thiol durch Probenentnahme und DTNB-Assay untersucht (Bild 4). Dabei wurden mit der Kontrolle (A) die anaeroben Bedingungen (B), und aerobe Bedingungen unter Zugabe von Katalase (C), Trolox (D) oder Katalase und Trolox (E) verglichen. In der Kontrolle unter aeroben Bedingungen ohne jeden Zusatz ergab sich eine maximale Ausbeute von 40%. Der Aufbau einer Stickstoffatmosphäre konnte diese auf zwei Drittel steigern, jedoch hatten sowohl Katalase als auch Trolox für sich einen noch stärkeren Effekt. Die Kombination von Katalase und Trolox zeigte in etwa das gleiche Ergebnis wie jede der Einzelsubstanzen.

Einfluss von einfallendem Licht und Reaktionstemperatur

Wie schon in der Einleitung ausgeführt, sind Nitrosothiole empfindlich gegenüber photochemischem Zerfall, und es ist bekannt, dass einfallendes Tageslicht falsch positive Signale im Biotin Switch Assay erzeugt. Dieser Effekt im Zusammenhang mit Methylhydrazin und den antioxidativen Zusätzen wurde untersucht, indem GSH und GSNO mit Methylhydrazin in Anwesenheit oder Abwesenheit von Katalase und Trolox, sowie in normalen Reaktionsgefäßen im Tageslicht, oder in verdunkelten Gefäßen in einem dunklen Raum, für zwei Stunden inkubiert wurde (Bild 5). Es ergab sich ein starker Effekt beider Faktoren – Licht und chemischer Schutz – auf die Ausbeute an Thiolen. Bei der Reduktion von GSNO war die Ausbeute mit Zusätzen im Dunkeln fünffach höher als ohne Zusätze im Sonnenlicht.

Reduktion unter optimierten Bedingungen

Unter den gefundenen optimierten Reaktionsbedingungen - Zusatz von Katalase und Trolox und Vermeidung einfallenden Lichts – wurde nun die Ausbeute der Reduktion von S-Nitrosothiolen bewertet. Als niedermolekulare Modellsustanzen dienten das S-Nitrosoglutathion (Bild 6a) und S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP, Bild 6b). Die Reaktion wurde wiederum, wie oben geschildert, in ihrem Verlauf photometrisch und durch regelmäßige Probenentnahme zur Bestimmung der Thiolkonzentration untersucht. Für die Reaktionen bei Raumtemperatur ergab sich ein annähernd quantitatives Vorliegen des abgebauten S-Nitrosothiols als reduziertes Thiol. Die Reaktion bei 37 °C (Bild 6c) verlief zwar deutlich schneller, bot jedoch nach Ablauf einer Stunde keine quantitative Ausbeute mehr.

Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der mithilfe von Methylhydrazin reduzierten S-Nitrosothiole unter Einsatz beider Thiol-Quantifizierungsmethoden wurden Eichgeraden mit GSNO vorbereitet, die S-Nitrosoverbindung unter optimierten Bedingungen mit Methylhydrazin reduziert und die korrespondierenden Thiole gemessen.

Die Nachweisgrenze bei Einsatz des DTNB-Assays lag bei 5 μ M, bzw. einer Stoffmenge von 4 nmol pro Probe (Bild 7a). Mit dem fluorometrischen Bodipy FL L-Cystin-Test konnten Konzentrationen unter 20 nM (oder 16 pmol pro Probe) nachgewiesen werden (Bild 7b), was in dem für physiologische Proben erforderlichen Bereich liegt.

Reduktion von S-Nitroso-Proteinen

Als Modelle für S-nitrosierte Proteine wurden das S-Nitrosoalbumin und das S-Nitrosopapain hergestellt. Analog zu den oben dargestellten niedermolekularen Substanzen wurde die Reaktion mit Methylhydrazin in ihrem zeitlichen Verlauf untersucht und es wurden Eichgeraden zur Bestimmung der Nachweisgrenze aufgestellt.

Die Reduktion des S-Nitrosoalbumins ließ sich analog zum S-Nitrosoglutathion vollständig verfolgen (Bild 8a). Die Halbwertszeit lag bei nur zehn Minuten, der Abbau

erfolgte also 14 mal schneller als für das niedermolekulare GSNO. Auch hier ließ sich quantitativ das reduzierte Thiol mit DTNB nachweisen.

Die Bestätigung dieser Ergebnisse mit S-Nitrosopapain als zweitem Modellprotein stieß auf experimentelle Schwierigkeiten. Die photometrische Beobachtung des S-Nitrosothiolabbaus bei 336 nm setzt eine ausreichend hohe Konzentration im dreistelligen mikromolaren Bereich voraus. Eine solche Lösung nitrosierten Papains wird aber bei Titration in einen pH-Bereich zwischen 7,0 und 9,4 lichtundurchlässig. Bei bekannter Empfindlichkeit der SH-Gruppe im aktiven Zentrum des Papains (Xian et al. 2000; Kanazawa et al. 1994) gegenüber oxidierenden Einflüssen konnte in der zwangsläufig bei pH 9,5 ablaufenden Reaktion kein Nachweis entstehenden Thiols erbracht werden. Jedoch wurde eine Abbaukinetik gezeigt, deren Halbwertszeit von etwa 10 Minuten dem für S-Nitrosoalbumin gefundenen Wert entspricht (Bild 8b). Durch Analyse der Reaktionskinetik wurde eine Aktivierungsenergie von nur $24,9 \pm 1,2$ kJ mol⁻¹ bestimmt, die somit 61% niedriger war als die Aktivierungsenergie des niedermolekularen GSNO (Tabelle 1). Die bei beiden Proteinen in gleicher Weise zu beobachtende Reaktionskinetik legte den Schluss nahe, dass aufgrund der niedrigeren Aktivierungsenergie bei hochmolekularem Reaktionspartner eine entsprechend beschleunigte Reaktion auch bei weiteren S-Nitrosoproteinen zu erwarten ist.

Die aus der Eichgeraden des Bodipy FL L-Cystin-Nachweises ermittelte Nachweisgrenze entsprach der für GSNO gefundenen Grenze unter 20 nM (Bild 8c).

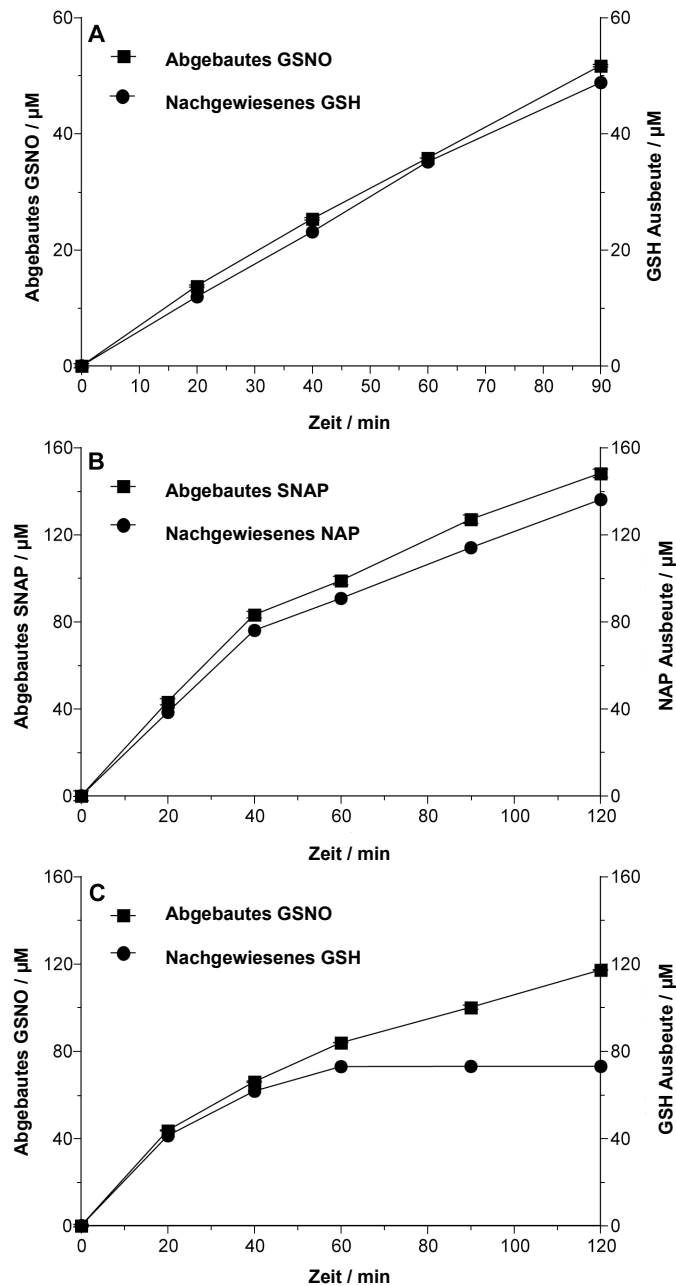


Bild 6: Reduktion von S-Nitrosothiolen zum korrespondierenden Thiol.
 Die Reaktion des jeweiligen Nitrosothiols ($200\text{ }\mu\text{M}$) in TEA-Puffer (100 mM , pH 8,7, EDTA $500\text{ }\mu\text{M}$, Trolox $400\text{ }\mu\text{M}$, Katalase 1300 U/l) wurde durch Zugabe von Methylhydrazin (10 mM) gestartet.
 Je gleichzeitige Messung und Darstellung des S-Nitrosothiol-Abbaus (■, spektrophotometrisch gemessen) und Ausbeute an Thiolen (●, DTNB-Testverfahren) über die Zeit.
 (A) S-Nitrosoglutathion,
 (B) S-Nitroso-N-acetylpenicillamin,
 (C) S-Nitrosoglutathion, 37°C

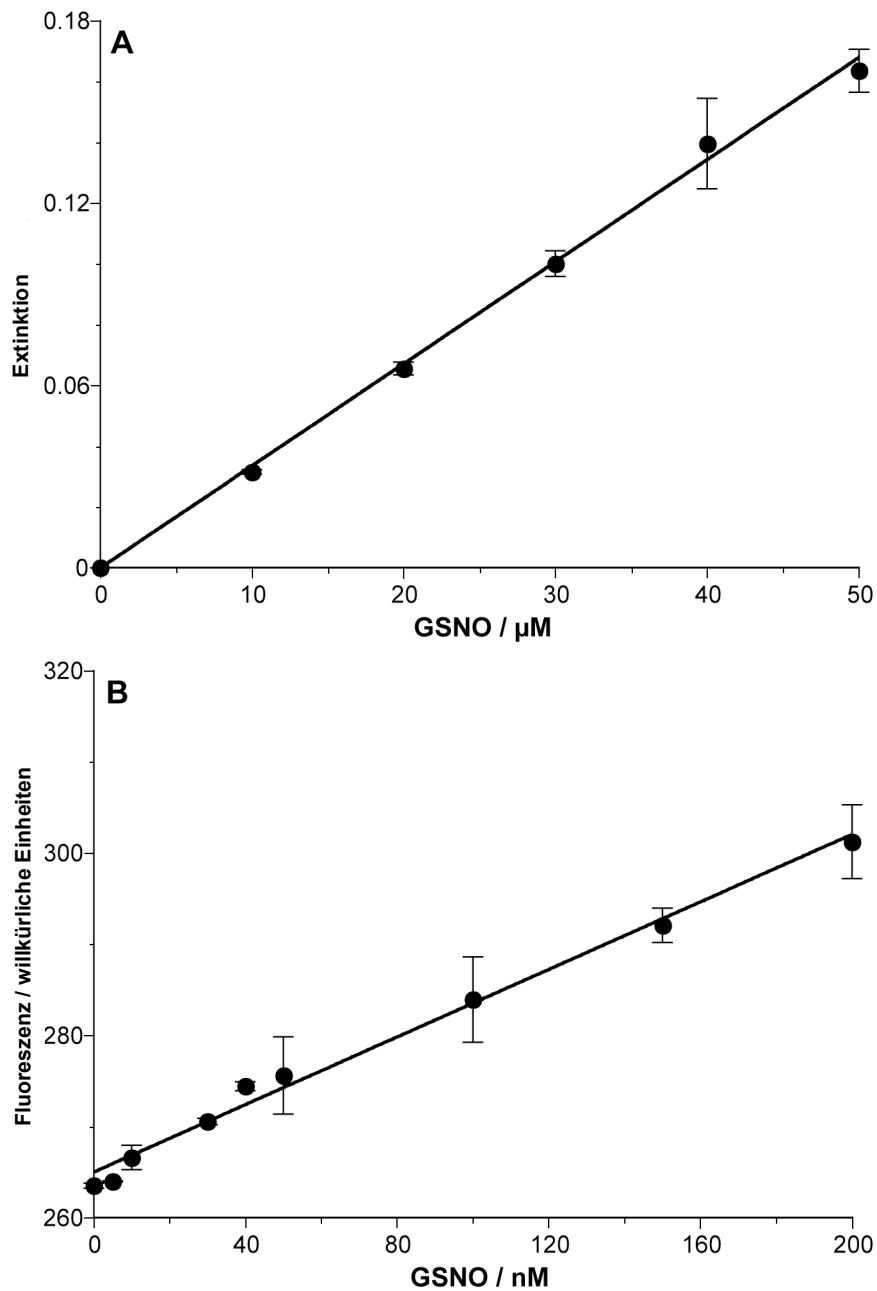


Bild 7: Eichgeraden für GSNO.

Variierende GSNO-Konzentrationen, Start der Reaktion in TEA-Puffer (100 mM, pH 8,7, EDTA 500 μM , Trolox 400 μM , Katalase 1300 U/l, 22°C) durch Zugabe von Methylhydrazin (10 mM).

(A) 10 – 50 μM , Messung mit dem DTNB-Verfahren nach 1h.

(B) 5 – 200 nM, fluoreszenzbasierte Messung mit Bodipy FL Cystin

(5 μM , Cystamin 10 μM , Inkubationszeit 48h)

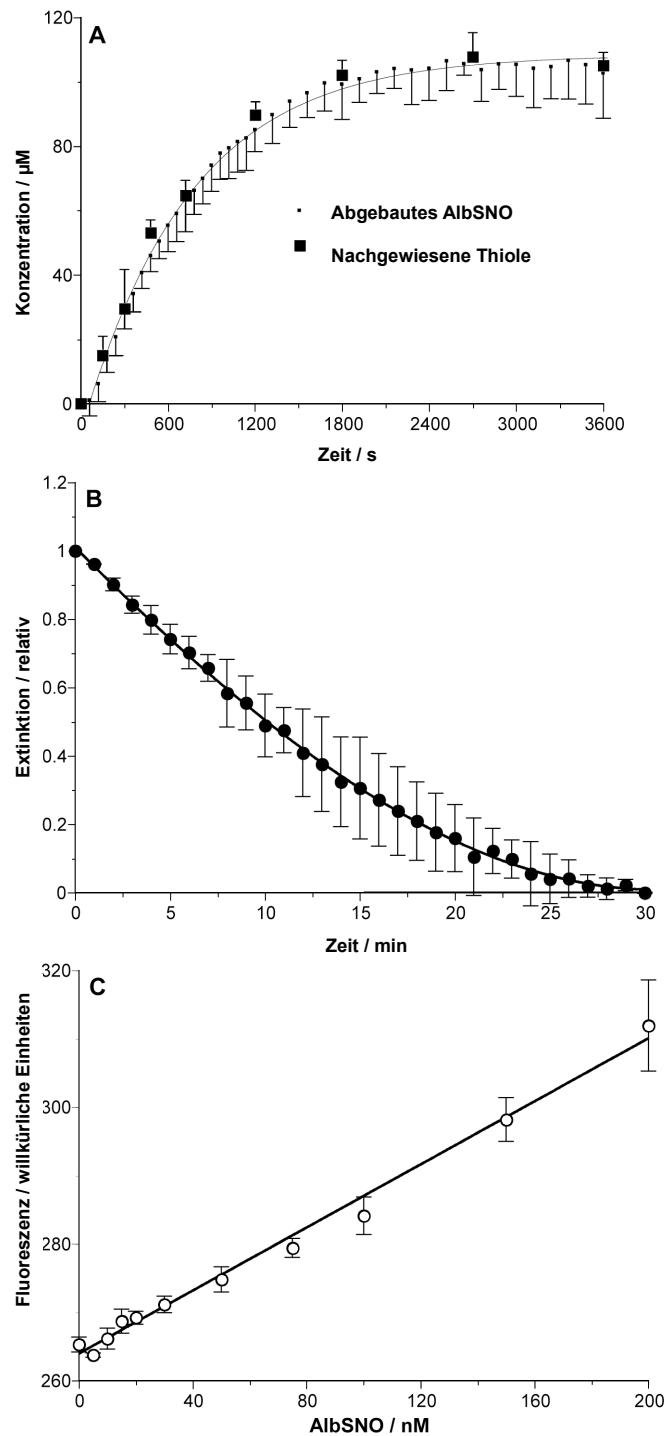


Bild 8: Reduktion von S-nitrosierter Proteine.

Die Reaktion des jeweiligen Proteins in TEA-Puffer (100 mM, pH 8,7, EDTA 500 μM , Trolox 400 μM , Katalase 1300 U/l) wurde durch Zugabe von Methylhydrazin (10 mM) gestartet. (A) S-Nitrosoalbumin (100 μM), je gleichzeitige Messung und Darstellung des S-Nitrosothiol-Abbaus (■, spektrophotometrisch) und der Thiolausbeute (•, DTNB-Testverfahren). (B) Abbau des S-Nitrosopapain (spektrophotometrische Messung). (C) Eichgerade für S-Nitrosoalbumin, 5 – 200 nM, fluoreszenzbasierte Messung mit Bodipy FL Cystin 5 μM , Cystamin 10 μM , Inkubationszeit 48h.

Histologische Schnitte

Als Gel-basiertes Verfahren ist die „Biotin Switch Technique“ nicht geeignet, S-Nitrosothiole auf histologischen Schnitten zu quantifizieren. Für diesen Zweck ist es notwendig, nach Reduktion der S-Nitrosothiole andere Thiol-Nachweisverfahren einzusetzen. So stehen etwa kommerzielle Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung, deren Fluorophor an ein thiolreaktives Maleimid gekoppelt ist. Zum Einsatz kam der Farbstoff „DyLight Maleimid 549“ auf Schnitten von Mäusedünndarm. Zur Validierung des Verfahrens mit Positiv- und Negativkontrollen wurden die Schnitte nach sieben verschiedenen Schemata vorbehandelt. Sämtliche Schnitte wurden als erstes deparaffiniert und abschließend gefärbt; dazwischen standen folgende vier Behandlungsschritte zur Verfügung:

I) Weitgehende Aktivierung freier Thiole durch Dithiothreitol

II) künstliche Nitrosierung freier Thiole durch N-Acetyl-N-nitrosotryptophan

III) Inaktivierung freier Thiole durch N-Ethylmaleimid

IV) Reduktion von S-Nitrosothiolen mit Methylhydrazin

Diese Schritte wurden nach folgendem Schema angewandt:

	I	II	III	IV	Bedeutung
(1)	-	-	X	-	Negativkontrolle: Alle Thiole inaktiviert
(2)	X	-	X	X	Negativkontrolle: Abbau aller S-Nitrosothiole, dann Inaktivierung aller bestehenden und erzeugten Thiole
(3)	X	X	X	-	Negativkontrolle: Nitrosierung aller Thiole, aber keine Reduktion der entstandenen S-Nitrosothiole
(4)	-	-	-	-	Positivkontrolle: Native Thiole
(5)	X	-	-	-	Positivkontrolle: Induzierbare Thiole (Native und durch DTT aktivierbare Thiole)
(6)	-	-	X	X	Native S-Nitrosothiole
(7)	X	X	X	X	S-Nitrosierbare Thiole: Aktivierung aller Thiole, Nitrosierung, Inaktivierung verbleibender freier Thiole, Reduktion der S-Nitrosothiole

Die Ergebnisse als mittlere Fluoreszenz unter dem Laser-Scanning-Mikroskop

(mindestens zwei Gesichtsfelder pro Schnitt und mindestens 12 Gesichtsfelder insgesamt von fünf verschiedenen Arbeitstagen) sind in Bild 9 zusammengefasst. Das Signal der NEM-blockierten Thiole, als Grundwert durch unspezifische Gewebefixierung des Farbstoffs, lag stabil bei $30 \pm 2,3$ Fluoreszenzeinheiten (1). Deutlich über allen anderen lagen das Signal der induzierbaren Thiole ((5), $135,8 \pm 62,1$). Die Werte für native Thiole ((4), $52,1 \pm 13,4$ Einheiten) und S-nitrosierbare Thiole ((7), $53,0 \pm 13,4$) befanden sich etwa im gleichen Bereich. Im direkten Vergleich zu letzterem Wert wurde bei den zwei spezifischen Negativkontrollen (2) und (3) nur jeweils einer der vier Behandlungsschritte weggelassen. Es ergaben sich Signale nahe dem Grundwert ((2) $31,1 \pm 0,9$; (3) $31,6 \pm 2,0$).

Das Signal für native S-Nitrosothiole schließlich lag bei $34,4 \pm 2,31$ Fluoreszenzeinheiten – statistisch signifikant ($p < 0,005$) über den drei Negativkontrollen. Entsprechende Versuche wurden, unter diversen Versuchsbedingungen und mit verschiedenen Farbstoffen, auch mit Ascorbinsäure als Reduktionsmittel durchgeführt. In keinem dieser Versuche gelang es, ein positives Signal für native S-Nitrosothiole zu gewinnen.

Biotin Switch Assay

In einem Biotin Switch Assay wurden die Reduktionsmittel Ascorbinsäure und Methylhydrazin miteinander verglichen. Als Negativkontrolle diente eine Albuminpräparation, deren Thiole mit NEM inaktiviert worden waren, sowie ein S-Nitrosoalbumin ohne Zugabe von Reduktionsmittel. Als Positivkontrolle wurde eine Präparation nativen Albumins genutzt – in genau solcher Konzentration, dass der Gehalt freier Thiole des nativen Albumins dem S-Nitrosothiol-Gehalt des S-Nitrosoalbumins entsprach. Der Blot wurde mit $1 \mu\text{g}$ Protein ausgeführt. In dem gezeigten Ergebnis (Bild 10a) zeigt sich, dass für das mit Ascorbinsäure reduzierte S-Nitrosoalbumin (Reihe 3) kein positives Signal gegenüber den Negativkontrollen vorliegt (Reihe 1 und 2), während das mit Methylhydrazin reduzierte S-Nitrosoalbumin (Reihe 4) annähernd der Positivkontrolle entspricht (Reihe 5). Bei Einsatz ansteigender Verdünnungen des Proteins von $2 \mu\text{g}$ bis $0,0625 \mu\text{g}$ konnte für Methylhydrazin, jedoch nicht für Ascorbinsäure, noch bis $0,125 \mu\text{g}$ ein positives Signal gezeigt werden (Bild 10b).

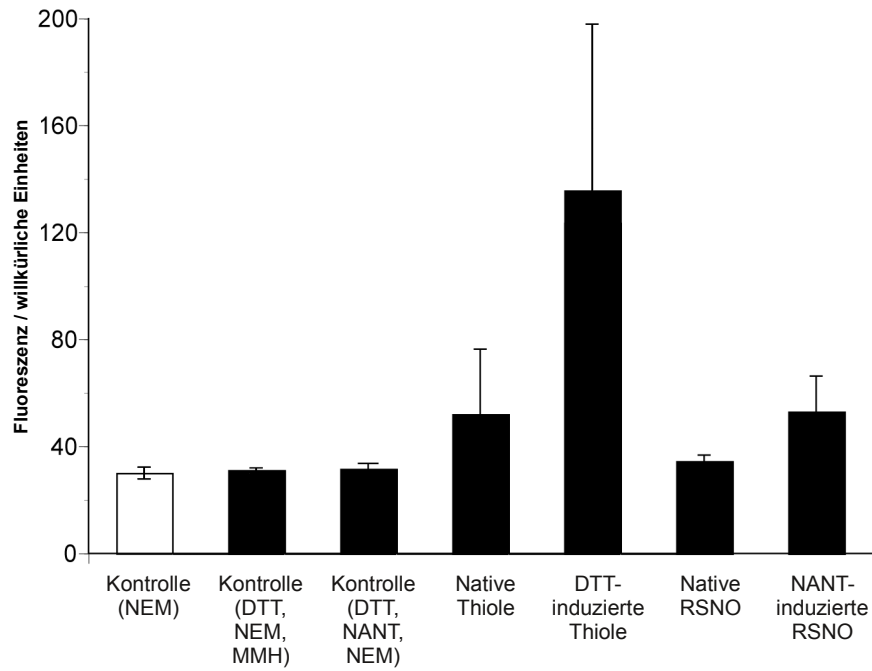


Bild 9: Auswertung histologischer Schnitte.

Schnitte von Mäusedünndarm, Färbung mit DyLight Maleimid 549, Angabe der mittleren Fluoreszenz.

Messwerte für native Thiole (4), native S-Nitrosothiole (6) und nitrosierte S-Nitrosothiole (7) signifikant größer ($p < 0,005$) als die Kontrollen.

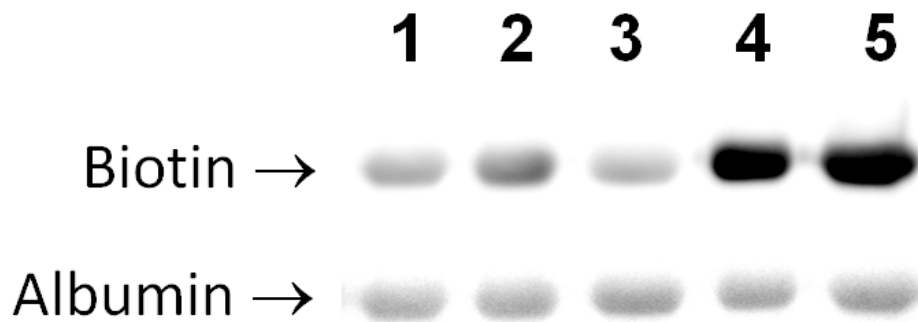
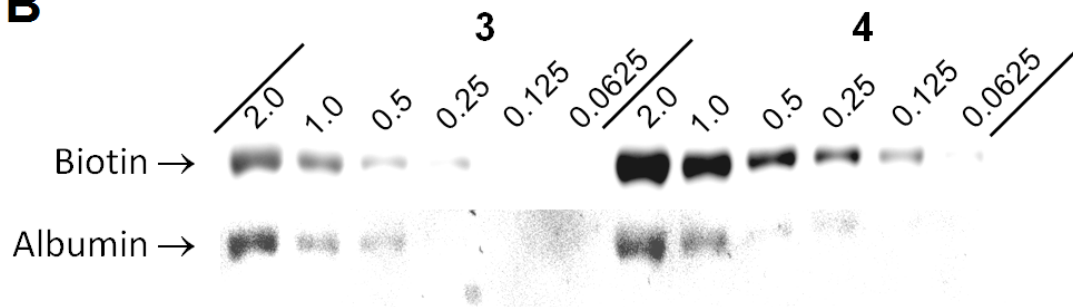
A**B**

Bild 10: Biotin-Switch-Assay (BST) mit S-Nitrosoalbumin.

- (A) (1) S-Nitrosoalbumin,
(2) NEM-blockiertes Albumin, Reduktion mit Methylhydrazin,
(3) S-Nitrosoalbumin, Reduktion mit Ascorbinsäure,
(4) S-Nitrosoalbumin, Reduktion mit Methylhydrazin,
(5) Natives Albumin.

(B) Vergleich der Sensitivität: Reduktion abnehmender Proteinmengen (µg, wie angegeben mit Ascorbinsäure (3) oder Methylhydrazin (4), entsprechend den Reihen (3) und (4) aus dem oberen Bild

Diskussion

Eignung als Reduktionsmittel

Die Chemikalie Methylhydrazin wird in dieser Arbeit im Hinblick auf ihre Eignung als Reduktionsmittel zum spezifischen Nachweis von S-Nitrosothiolen untersucht.

In biologischen Proben ist davon auszugehen, dass ubiquitär Disulfide in hoher Konzentration vorhanden sind. Da schon eine Reihe von Chemikalien bekannt sind, die zwar gründlich und effizient S-Nitrosothiole, gleichzeitig aber auch Disulfide reduzieren, muss zunächst der Nachweis gelingen, dass Methylhydrazin nicht mit Disulfiden reagiert.

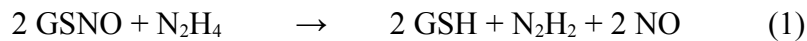
Das Verhalten der beiden Reduktionsmittel Methylhydrazin und Ascorbinsäure gegenüber Disulfiden wurde mit Bodipy FL L-Cystin als Indikatormolekül untersucht. In diesem kommerziell erhältlichen Thiol-Reagenz ist je ein Fluorophor an die beiden Aminogruppen eines Cystins gebunden. Im oxidierten Zustand des Disulfids kommt es zur Fluoreszenzlöschung zwischen den beiden örtlich benachbarten Fluorophoren. Wird die S-S-Brücke aber gespalten, sind beide – voneinander entfernt – in der Lage, Licht zu emittieren. In der Anwesenheit von Thiolen kommt es zur Einstellung eines Gleichgewichts aus gemischten Disulfiden, die ebenfalls keiner Fluoreszenzlöschung unterliegen. Genauso aber kann Bodipy FL L-Cystin als sehr empfindlicher Indikator für jede Reduktion oder Spaltung von Disulfiden genutzt werden.

Es wurde gezeigt, dass Methylhydrazin nicht zu einer Spaltung der Disulfid-Brücke beiträgt. In einem weiteren Versuch konnte dieses Ergebnis bestätigt werden, als Methylhydrazin bei Inkubation mit hoher Konzentration des physiologischen Disulfids GSSG (oxidiertes Glutathion) nicht zu einem messbaren Auftreten von reduziertem Glutathion (GSH) führte. Die scheinbar höhere Ausbeute mit Ascorbinsäure konnte auf eine unterschiedliche Geschwindigkeit der Reduktionsreaktion zurückgeführt werden, so dass letztlich die Ausbeute mit Methylhydrazin deutlich höher war als bei Verwendung von Ascorbinsäure. Bekanntermaßen entstehen im Rahmen letzterer Reaktion reaktive Zwischenstufen, insbesondere Nitroxyl (HNO/NO^-), die Thiole

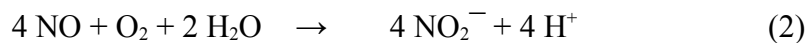
oxidieren können (Kirsch et al. 2009) und damit das relativ schlechte Ergebnis erklären.

Der Reaktionsmechanismus

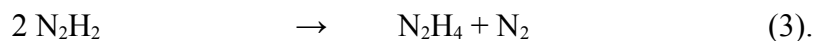
Eine Reaktion zwischen S-Nitrosothiolen und Hydrazin wurde zwar beschrieben (Munro et al. 1999) aber nicht näher charakterisiert. Da ^{15}N -angereichertes Hydrazin, jedoch nicht Methylhydrazin, kommerziell erhältlich ist, führten wir kernresonanzspektrometrische Untersuchungen mit diesem eng verwandten Molekül durch. Unter der Annahme, dass Hydrazin sich gegenüber S-Nitrosothiolen als reines Reduktionsmittel in einem Außensphären-Mechanismus verhält, würden zunächst Diimin (Gowland et al. 1992) und Stickstoffmonoxid entstehen:



Unter aeroben Bedingungen würde NO bei alkalischem pH zu Nitrit oxidiert:



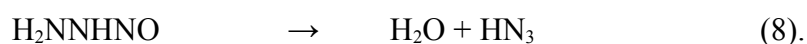
und das Diimin zu Hydrazin und Stickstoff dismutieren:



Somit wären Nitrit und Stickstoff die Endprodukte des Außensphären-Mechanismus. Aufgrund der chemischen Eigenschaften der S-Nitrosothiole sollte ein Transnitrosierungsprozess nicht außer Acht gelassen werden, bei dem Nitrosylhydrazin und das korrespondierende Thiol entstehen würden:



Der Zerfall des Nitrosylhydrazins ist höchst komplex. Wenn jedoch durch die Reaktionsbedingungen, insbesondere bei hoher Hydrazinkonzentration, eine zweite Transnitrosierung ausgeschlossen werden kann, sind zwei Hauptwege des Zerfalls gegeben, je nachdem ob Wasser oder Ammoniak abgespalten wird (Gowland et al. 1992). Im stark Säuren zerfällt Nitrosylhydrazin ausschließlich unter Abspaltung von Wasser zu Stickstoffwasserstoffsäure:



Bei höherem pH, somit auch bei den gewählten Reaktionsbedingungen (pH 8,7),

überwiegt der Ammoniakweg



mit Distickstoffmonoxid und Ammoniak als Endprodukten. Tatsächlich konnte experimentell die Kernresonanz dieser beiden Moleküle nachgewiesen werden, nicht jedoch Stickstoff oder Nitrit. Somit konnte die Transnitrosierungsreaktion gemäß Gleichung (7) als primärer Reaktionsschritt nachgewiesen werden, eine Redoxreaktion nach Gleichung (1) findet nicht statt.

Unter den Nebenprodukte in der Aminregion konnte eines identifiziert werden, das dem Sulfinamid des GSNO, $\text{GS}(\text{O})^{15}\text{NH}_2$, entsprach. Zur Bestätigung dieser Annahme führten wir die Reaktion weiterhin mit ^{15}N -angereichertem Hydrazin, aber einem GSNO mit natürlicher Verteilung der Stickstoffisotopen durch. Da die gesehene Resonanz nun nicht mehr detektiert wurde, durfte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass es sich tatsächlich um ein vom Stickstoff der GSNO-Nitrosogruppe abhängiges Produkt und somit um das genannte Sulfinamid handelt. Nach der Literatur (S. P. Singh et al. 1996) sind vier GSH-Moleküle erforderlich, um ein GSNO in sein Sulfinamid umzuwandeln. Diese Nebenreaktion kann daher nur zum Ende der Hydrazin-abhängigen Reaktion mit sehr geringer Ausbeute ablaufen.

Optimierte Reaktionsbedingungen

Nachdem die prinzipielle Eignung als Reduktionsmittel gesichert und die Natur der Reaktion bekannt war, galt es, die Ausbeute an reduziertem Thiol zu optimieren. Wie in der Einleitung ausgeführt, liegt hier gerade der Schwachpunkt des etablierten Reduktionsmittels Ascorbinsäure. Methylhydrazin bringt allerdings als hochreaktive Chemikalie mit Neigung zur Autooxidation seine ganz eigenen Probleme mit sich. Insbesondere ist beschrieben, dass Wasserstoffperoxid und freie Radikale entstehen. Es zeigte sich, dass die Anwesenheit von Methylhydrazin zu einem deutlichen Abbau anwesender Thiole führt. Zu befürchten war, dass möglicherweise zunächst effizient entstandene Thiole in einer Nebenreaktion wieder verloren gehen.

Zwei häufig eingesetzte Chemikalien boten sich an, um *in vitro* oxidative Effekt abzumildern: Das Enzym Katalase baut Wasserstoffperoxid ab; das wasserlösliche

Vitamin-E-Derivat Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) ist in der Lage, freie Radikale chemisch zu inaktivieren (Salgo et al. 1995).

Es konnte ein deutlicher Effekt der Einzelsubstanzen Katalase und Trolox auf die Ausbeute von freien Thiolen nachgewiesen werden. Ein additiver Effekt durch Kombinationsgabe zeigte sich, trotz vollständig verschiedener Wirkmechanismen, nicht. Im gezeigten Experiment war jedoch die Konzentration der Thiole noch in derselben Größenordnung wie die von Trolox, so dass eine Reaktion reaktiver Spezies mit Thiolen vor einem Kontakt mit Trolox möglich war. Da ein nachteiliger Effekt der Kombination höchst unwahrscheinlich, ein günstiger Effekt bei anderen Reaktionsbedingungen jedoch plausibel erscheint, wurden in allen folgenden Experimenten beide Additive eingesetzt.

Ohnehin wird bei Einsatz der „Biotin-Switch“-Technik einfallendes Tageslicht vermieden, weil Artefakte beschrieben wurden (Huang et al. 2006) und Nitrosothiole photochemisch degradieren (Szaciłowski et al. 2001). Wir konnten auch für die Reduktionsreaktion mit Methylhydrazin einen ausgeprägten ungünstigen Einfluss zeigen, so dass die Exposition gegenüber einfallendem Licht so weit wie möglich vermieden wurde.

Die Reduktion von S-Nitrosothiolen *in vitro*

Unter optimierten Bedingungen gelang die annähernd quantitative Reduktion der niedermolekularen S-Nitrosothiole GSNO und SNAP. Unter Raumtemperatur kam es auch nach 90 Minuten nicht zu einem deutlichen Defizit zwischen abgebautem S-Nitrosothiol (theoretisch maximale Ausbeute) und nachgewiesenem Thiol (tatsächliche Ausbeute).

Die Halbschwertszeit von GSNO bei Raumtemperatur ist mit 2:20h recht lang, bei 37 °C läuft die Reaktion schneller ab, allerdings scheint der Thiolabbau durch oxidative Prozesse noch mehr beschleunigt zu sein. Der Einsatz einer höheren Reaktionstemperatur scheidet also aus. GSNO diene lediglich als Modellschubstanz; praktisch bedeutsam sind S-Nitrosoproteine, die, wie sich in der Folge zeigte, ohnehin wesentlich schneller mit Methylhydrazin reagieren.

Man geht davon aus, dass die physiologischen Konzentrationen von S-Nitrosothiolen im nanomolaren Bereich liegen – aufgrund methodischer Unzulänglichkeiten bewegten sich die beschriebenen Werte in über 35 Veröffentlichungen der letzten 15 Jahre zwischen 10 μ M und 0 nM (Gladwin et al. 2006). Traditionelle Nachweise wie das Verfahren nach Ellman (DTNB), aber auch schon empfindlichere enzymbasierte Methoden wie das „Papain-Assay“ (R. Singh et al. 1993) sind hierfür ungeeignet. Mit dem „Bodipy FL L-Cystin“ liegt glücklicherweise ein kommerziell erhältlicher, in der Praxis bis auf eine leichte Unbequemlichkeit durch die notwendige Inkubationszeit von 48 h, gut anwendbarer Thioldnachweis vor, dessen Nachweisgrenze nach eigenen Voruntersuchungen im untersten nanomolaren Bereich zu finden ist.

Es ließen sich für die Methylhydrazin-basierte S-Nitrosothiolreduktion Eichgeraden erzeugen, mit dem klassischen Thioldnachweis DTNB im mikromolaren Bereich, und mit dem fluoreszenzbasierten Verfahren im nanomolaren Bereich mit einer Nachweisgrenze unter 20 nM. Damit erlaubt das Verfahren, S-Nitrosothiole im vermuteten physiologischen Konzentrationsbereich nachzuweisen.

Die Ergebnisse für niedermolekulare S-Nitrosothiole konnten mit S-nitrosierten Proteinen bestätigt werden. Als Modell dienten mit Albumin und Papain zwei Proteine, die eine einzelne freie Cystein-SH-Gruppe besitzen, bei Papain im aktiven Zentrum des Enzyms. S-Nitrosoalbumin ist in menschlichem Plasma beschrieben worden (Marley et al. 2001), S-Nitrosopapain wurde schon zuvor als Modellschubstanz eingesetzt (Kirsch et al. 2009). Interessanterweise war die Halbwertszeit der S-Nitrosoverbindung beim Abbau mit Methylhydrazin bei beiden Proteinen mit ca. 10 min für einen fünfzigprozentigen Abbau sehr viel kürzer als für alle niedermolekularen Substanzen. Es liegt nahe, Einflüsse der Peptidbindung auf die Thiolgruppe oder eine für den Angriff des Methylhydrazins bessere sterische Position des auf der Proteinoberfläche fixierten Thiols zu vermuten. Nebenreaktionen zwischen S-Nitrosothiolen und Thiolen können teils nur mit niedermolekularen Molekülen vonstatten gehen.

Histologische Schnitte

Ein Nachweis von S-Nitrosothiolen auf histologischen Schnitten ist bisher noch nicht beschrieben. Ein solches Verfahren könnte Einsicht in die Verteilung von S-Nitrosothiolen im Gewebe erlauben und zahlreiche, als Gewebeschnitte vorliegende Proben der Untersuchung zugänglich machen.

Zunächst musste der Thiolnachweis durch den fluoreszierenden Farbstoff validiert werden. Das Signal für native Thiole auf unbehandelten Schnitten und das etwa zweieinhalb Mal so große Signal der DTT-aktivierten Thiole, das als maximal möglicher Wert gelten kann, belegten im Vergleich zum Nullwert des NEM-inaktivierten Schnitts, dass die Messung von Thiolen erfolgt. Die Positivkontrollen lagen immer deutlich über den anderen Messwerten, jedoch ergab sich eine große Streubreite, weniger zwischen einzelnen Schnitten, vielmehr zwischen verschiedenen Arbeitstagen. Es erscheint plausibel, dass es in der präanalytischen Phase der Aufbereitung der Schnitte und Deparaffinisierung und auch während der Waschschrte zu nicht vollständig kontrollierbarer Thioloxydation auf der Schnittoberfläche kommt, gerade durch Kontakt mit Luftsauerstoff. Im Gegensatz zu den nativen Thiolen liegen die nativen S-Nitrosothiole schon in einer chemisch eher „geschützten“ Form vor, die möglicherweise nicht so empfindlich gegen spontane Oxydierung und Zerfall ist.

Unter Einsatz von Methylhydrazin als Reduktionsmittel und einem kommerziellen Fluoreszenzfarbstoff konnte ein positives Signal für native S-Nitrosothiole auf Schnitten des Dünndarms gesunder Mäuse erhalten werden. Die entscheidende Frage ist die nach der Spezifität dieses Signals für S-Nitrosothiole im Einsatz mit der in diesem Zusammenhang noch nicht untersuchten Chemikalie Methylhydrazin. Es gilt auszuschließen, dass es zu unspezifischen Reaktionen zwischen Proteinen des Schnitts und Methylhydrazin kommt und so möglicherweise Farbstoff gebunden wird. Für diesen Nachweis ist zunächst die Messung der S-nitrosierbaren Thiole notwendig. Schnitte dieser Gruppe unterlagen vier Behandlungsschritten: Maximal möglicher Aktivierung freier Thiole mit DTT, deren S-Nitrosierung mit NANT, der Inaktivierung noch vorhandener freier Thiole mit NEM und Reduktion der S-Nitrosothiole durch Methylhydrazin. Das recht hohe erhaltene Signal zeigt, dass das Verfahren grundsätzlich

S-Nitrosothiole nachweisen kann. Wird die NANT-Nitrosierung unterlassen, liegen keine S-Nitrosothiole vor, da auch alle nativen S-Nitrosothiole durch DTT abgebaut wurden. Jedes positive Signal in einer solchen Kontrolle wäre unspezifisch, möglicherweise durch Einfluss von Methylhydrazin. Wird die Reduktion mit Methylhydrazin unterlassen, liegen zwar S-Nitrosothiole vor, aber keine freien Thiole. Auch hier wäre jedes positive Signal unspezifisch, wie etwa durch Nebeneffekte des NANT oder Reste von DTT. Eben diese beiden spezifischen Negativkontrollen waren aber negativ, wodurch die Spezifität des S-Nitrosothiolsnachweises gezeigt wurde.

Insgesamt ergibt sich ein zwar signifikant positives Signal für native S-Nitrosothiole im Vergleich zur Negativkontrolle, jedoch muss aufgrund der Streubreite der Methode und der geringen Signalgröße eine gewisse Skepsis für den praktischen Einsatz verbleiben. Es würde in jedem Fall eine Analyse zahlreicher Proben und statistische Auswertung notwendig sein, um mit der gezeigten Methodik in Zukunft Ergebnisse zu erzielen.

Die Biotin-Switch-Technik

Die „Biotin-Switch“-Technik unter Einsatz von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel ist das Standardverfahren zum Nachweis von S-Nitrosothiolen. Ein neues Reduktionsmittel muss also insbesondere im Rahmen dieser Anwendung eine Verbesserung nachweisen. Als Negativkontrolle wählten wir eine Albuminpräparation, deren freie Thiolgruppen mit NEM blockiert worden waren. Mit dem hierfür gezeigten negativen Signal konnten somit unspezifische Interaktionen zwischen Methylhydrazin und dem Protein, etwa eine Reduktion der bekannten Disulfidbrücken (Markus et al. 1957), oder der physiologisch vorhandenen (Era et al. 1995; Era et al. 1988) oder im Rahmen der Proteinisolierung entstandenen (Turell et al. 2009) oxidierten Thiolderivate ausgeschlossen werden.

Als Positivkontrolle diente natives Albumin, dessen Gehalt an freiem Thiol genau der Konzentration des S-Nitrosothiols im nitrosierten Albumin entsprach und somit den absoluten Höchstwert des richtig-positiven Signals darstellte.

Während mit der initial gewählten Proteinmenge Ascorbinsäure kein positives Signal

erzeugt werden konnte, lag Methylhydrazin im Bereich der Positivkontrolle. Diese Überlegenheit bestätigte sich im Rahmen einer Verdünnungsreihe. Im semiquantitativen Blot ergab sich somit eine etwa vierfach verbesserte Nachweisgrenze und fast quantitative Ausbeute durch Einsatz von Methylhydrazin anstelle von Ascorbinsäure.

Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) ist als einer der bedeutendsten physiologischen Mediatoren an zahlreichen Regulationsvorgängen beteiligt. Während NO sehr rasch abgebaut wird, stellen die aus einer Reaktion von NO mit Thiolen im Organismus entstehenden S-Nitrosothiole stabilere Verbindungen dar. Nachdem S-Nitrosothiole zunächst als mögliche Transport- und Speicherformen des kurzlebigen NO angesehen wurden, kann die S-Nitrosierung von Proteinen eine posttranslationale Modifikation darstellen und intrazelluläre Signalwege beeinflussen.

Zur Untersuchung dieser postulierten Abläufe ist letztendlich der analytische Nachweis der S-Nitrosierung von Proteinen notwendig, was üblicherweise mit Hilfe der sogenannten „Biotin-Switch“-Technik erfolgt. Hierbei werden die S-Nitrosothiole zum korrespondierenden Thiol reduziert, das im Weiteren mit einem Antikörper nachgewiesen wird. Diese Reduktion bestimmt die Spezifität und Sensitivität des Nachweises. Als Reagenz für diesen entscheidenden Schritt ist ausschließlich Ascorbinsäure etabliert, obwohl hiermit nur suboptimale, nicht stöchiometrische Ausbeuten möglich sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass der Raketentreibstoff Methylhydrazin als spezifisches und effektives Reduktionsmittel für die Reduktion von S-Nitrosothiolen eingesetzt werden kann. Die Reaktion generiert ausschließlich die korrespondierende Thiol-Funktion, ohne unspezifisch andere Verbindungen, wie insbesondere Disulfide, zu reduzieren. Die Ergebnisse konnten mit niedermolekularen S-Nitrosothiolen wie auch mit S-nitrosierten Proteinen bestätigt werden; es war möglich, durch Optimierung der Reaktionsbedingungen eine hohe Reaktionsausbeute (>90%) zu erzielen. Der zugrunde liegende chemische Reaktionsmechanismus wurde aufgeklärt.

Durch ein angepasstes Färbeprotokoll mit Einsatz des neuen Reduktionsmittels konnte erstmals fluoreszenzmikroskopisch ein Signal für native S-Nitrosothiole auf histologischen Schnitte nachgewiesen werden. Schließlich gelang es, in der „Biotin-Switch“-Technik die Überlegenheit von Methylhydrazin zu demonstrieren.

Literaturverzeichnis

1. Aquart, D.V. und Dasgupta, T.P. (2005):
The reaction of S-nitroso-N-acetyl-d,l-penicillamine (SNAP) with the angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril-mechanism of transnitrosation.
Org. Biomol. Chem., 3 (9), 1640–1646.
2. Askew, S.C., Barnett, D.J., McAninly, J. und Williams, D.L.. (1995):
Catalysis by Cu 2+ of nitric oxide release from S-nitrosothiols (RSNO).
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1995 (4), 741–745.
3. Audrieth, L.F. und Mohr, P.H. (1951):
Autoxidation of Hydrazine. Effect of Dissolved Metals and Deactivators.
Ind. Eng. Chem., 43 (8), 1774–1779.
4. Barnett, D.J., McAninly, J. und Williams, D.L.. (1994):
Transnitrosation between nitrosothiols and thiols.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1994 (6), 1131–1133.
5. Barone, V., Cossi, M. und Tomasi, J. (1997):
A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model.
J. Chem. Phys., 107 (8), 3210–3221.
6. Blough, N.V. und Zafiriou, O.C. (1985):
Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution.
Inorg. Chem., 24 (22), 3502–3504.
7. Bunton, C.A., Llewellyn, D.R. und Stedman, G.J. (1957):
Recent Aspects of the Inorganic Chemistry of Nitrogen.
London: Chemical Society; s. bes. S. 113–120.
8. Butler, A.R. und Williams, D.L.. (1993):
The physiological role of nitric oxide.
Chem. Soc. Rev., 22 (4), 233–241.
9. Dicks, A.P., Swift, H.R., Williams, D.L., Butler, A.R., Al-Sa'doni, H.H. und Cox, B.G. (1996):
Identification of Cu+ as the effective reagent in nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO).
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1996 (4), 481–487.
10. Ellis, S.R.M., Jeffreys, G.V. und Hill, P. (1960):
Oxidation of hydrazine in aqueous solution.
J. Appl. Chem., 10 (8), 347–352.

11. Ellman, G.L. (1958):
A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans.
Arch. Biochem. Biophys., 74 (2), 443–450.
12. Era, S., Hamaguchi, T., Sogami, Masaru, Kuwata, K., Suzuki, E., Miura, K., Kawai, K., Kitazawa, Y., Okabe, H., Noma, A. und Miyata, S. (1988):
Further studies on the resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatography.
Int. J. Pept. Protein Res., 31 (5), 435–442.
13. Era, S., Kuwata, K., Imai, H., Nakamura, K., Hayashi, T. und Sogami, M (1995):
Age-related change in redox state of human serum albumin.
Biochim. Biophys. Acta, 1247 (1), 12–16.
14. Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V. und Reiner, E. (2003):
Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment.
Anal. Biochem., 312 (2), 224–227.
15. Faulstich, H., Tews, P. und Heintz, D. (1993):
Determination and Derivatization of Protein Thiols by n-Octyldithionitrobenzoic Acid.
Anal. Biochem., 208 (2), 357–362.
16. Forrester, M.T., Foster, M.W., Benhar, M. und Stamler, J.S. (2009):
Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique.
Free Radical Biol. Med., 46 (2), 119–126.
17. Forrester, M.T., Foster, M.W. und Stamler, J.S. (2007):
Assessment and application of the biotin switch technique for examining protein S-nitrosylation under conditions of pharmacologically induced oxidative stress.
J. Biol. Chem., 282 (19), 13977–13983.
18. Gamberini, M., Cidade, M., Valotta, L., Armelin, M. und Leite, L. (1998):
Contribution of hydrazines-derived alkyl radicals to cytotoxicity and transformation induced in normal c-myc-overexpressing mouse fibroblasts.
Carcinogenesis, 19 (1), 147–155.
19. Gaston, B., Reilly, J., Drazen, J.M., Fackler, J., Ramdev, P., Arnette, D., Mullins, M.E., Sugarbaker, D.J., Chee, C. und Singel, D.J. (1993):
Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90 (23), 10957.
20. Gaunt, H. und Wetton, E.A.M. (1966):
The reaction between hydrazine and oxygen in water.
J. Appl. Chem., 16 (6), 171–176.

21. Gilbert, E.C. (1929):
Studies on Hydrazine. The Auto-Oxidation.
J. Am. Chem. Soc., 51 (9), 2744–2751.
22. Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Colombo, R., Milzani, A. und Rossi, R. (2008):
Is ascorbate able to reduce disulfide bridges? A cautionary note.
Nitric Oxide, 19 (3), 252–258.
23. Gladwin, M.T., Wang, X. und Hogg, N. (2006):
Methodological vexation about thiol oxidation versus S-nitrosation—A commentary on “An ascorbate-dependent artifact that interferes with the interpretation of the biotin-switch assay”.
Free Radical Biol. Med., 41 (4), 557–561.
24. Gow, A., Doctor, A., Mannick, J. und Gaston, B. (2007):
S-Nitrosothiol measurements in biological systems.
J. Chromatogr. B, 851 (1-2), 140–151.
25. Gowland, R.J., Howes, K.R. und Stedman, G. (1992):
Nitrogen-15 tracer evidence discounting the occurrence of a cyclic azide intermediate in the reaction between nitrous acid and hydrazine.
J. Chem. Soc., Dalton Trans., (5), 797–799.
26. Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H.E. und Stamler, J.S. (2005):
Protein S-nitrosylation: purview and parameters.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 6 (2), 150–166.
27. Huang, B. und Chen, C. (2006):
An ascorbate-dependent artifact that interferes with the interpretation of the biotin switch assay.
Free Radical Biol. Med., 41, 562–567.
28. Hussain, S.M. und Frazier, J.M. (2002):
Cellular Toxicity of Hydrazine in Primary Rat Hepatocytes.
Toxicol. Sci., 69 (2), 424–432.
29. Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D., Tempst, P. und Snyder, S.H. (2001):
Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide.
Nat. Cell Biol., 3 (2), 193–197.
30. Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J. und Stamler, J.S. (1996):
S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control.
Nature, 380 (6571), 221–226.

31. Jones, D.P., Carlson, J.L., Mody Jr, V.C., Cai, J., Lynn, M.J. und Sternberg Jr, P. (2000):
Redox state of glutathione in human plasma.
Free Radical Biol. Med., 28, 625–635.
32. Kanazawa, H., Fujimoto, S. und Ohara, A. (1994):
On the mechanism of inactivation of active papain by ascorbic acid in the presence of cupric ions.
Biol. Pharm. Bull., 17 (6), 789–793.
33. Kettenhofen, N.J., Broniowska, K.A., Keszler, A., Zhang, Y. und Hogg, N. (2007):
Proteomic methods for analysis of S-nitrosation.
J. Chromatogr. B, 851 (1-2), 152–159.
34. Kharitonov, V.G., Sundquist, A.R. und Sharma, V.S. (1995):
Kinetics of Nitrosation of Thiols by Nitric Oxide in the Presence of Oxygen.
J. Biol. Chem., 270 (47), 28158 –28164.
35. Kirsch, M., Büscher, A.-M., Aker, S., Schulz, R. und Groot, H. de (2009):
New insights into the S-nitrosothiol-ascorbate reaction. The formation of nitroxyl.
Org. Biomol. Chem., 7 (9), 1954–1962.
36. Lancaster, J.R. und Hibbs, J.B. (1990):
EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87 (3), 1223.
37. Landino, L.M., Koumas, M.T., Mason, C.E. und Alston, J.A. (2006):
Ascorbic acid reduction of microtubule protein disulfides and its relevance to protein S-nitrosylation assays.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 340 (2), 347–352.
38. Li, S. und Whorton, A.R. (2003):
Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B in intact cells by S-nitrosothiols.
Arch. Biochem. Biophys., 410 (2), 269–279.
39. López-Sánchez, L.M., Jordi Muntané, J., Mata, M. de la und Rodríguez-Ariza, A. (2009):
Unraveling the S-nitrosoproteome: Tools and strategies.
Proteomics, 9 (4), 808–818.
40. Lurker, P.A. (1976):
Catalytic Deoxygenation of Aqueous Solution by Hydrazine.
Technical Documentary Report Nr. AMRL-TR-76–23, Aerospace Medical Research Laboratory, Wright-Patterson Air Force Base, Dayton, Ohio.

41. MacNaughton, M.G., Urda, G.A. und Bowden, S.E. (1978):
Oxidation of Hydrazine in Aqueous Solutions.
Report Nr. CEEDO-TR-78-11. Civil and Environmental Engineering Development
Office, Tyndall Air Force Base, Florida.
42. Markus, G. und Karush, F. (1957):
The Disulfide Bonds of Human Serum Albumin and Bovine γ -Globulin I.
J. Am. Chem. Soc., 79 (1), 134–139.
43. Marley, R., Patel, R.P., Orie, N., Ceaser, E., Darley-USmar, V. und Moore, K.
(2001):
Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by
nitric oxide.
Free Radical Biol. Med., 31 (5), 688–696.
44. Martínez-Ruiz, A. und Lamas, S. (2004):
S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction.
Cardiovasc. Res., 62 (1), 43.
45. Meyer, D.J., Kramer, H., Ozer, N., Coles, B. und Ketterer, B. (1994):
Kinetics and equilibria of S-nitrosothiol-thiol exchange between glutathione,
cysteine, penicillamines and serum albumin.
FEBS Lett., 345 (2-3), 177–180.
46. Montgomery, J.A., Frisch, M.J., Ochterski, J.W. und Petersson, G.A. (2000):
A complete basis set model chemistry. VII. Use of the minimum population
localization method.
J. Chem. Phys., 112 (15), 6532–6542.
47. Munro, A.P. und Williams, D.L.. (1999):
Reactivity of nitrogen nucleophiles towards S-nitrosopenicillamine.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, (10), 1989–1993.
48. Munro, A.P. und Williams, D.L.. (2000):
Reactivity of sulfur nucleophiles towards S-nitrosothiols.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2, 1794–1797.
49. Noble, D.R. und Williams, D.L.. (2001):
Formation and reactions of S-nitroso proteins.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, (1), 13–17.
50. Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. und Moncada, S. (1987):
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived
relaxing factor.
Nature, 327 (6122), 524–526.

51. Riener, C.K., Kada, G. und Gruber, H.J. (2002):
Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine.
Anal. Bioanal.Chem., 373 (4-5), 266–276.
52. Salgo, M.G., Bermudez, E., Squadrito, G.L. und Pryor, W.A. (1995):
DNA Damage and Oxidation of Thiols Peroxynitrite Causes in Rat Thymocytes.
Arch. Biochem. Biophys., 322 (2), 500–505.
53. Saville, B. (1958):
A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols.
The Analyst, 83 (993), 670–672.
54. Singh, R., Blättler, W.A. und Collinson, A.R. (1993):
An amplified assay for thiols based on reactivation of papain.
Anal. Biochem., 213 (1), 49–56.
55. Singh, S.P., Wishnok, J.S., Keshive, M., Deen, W.M. und Tannenbaum, S.R. (1996):
The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93 (25), 14428–14433.
56. Smith, J.N. und Dasgupta, T.P. (2000):
Kinetics and Mechanism of the Decomposition of S-Nitrosoglutathione by
-Ascorbic Acid and Copper Ions in Aqueous Solution to Produce Nitric Oxide.
Nitric Oxide, 4 (1), 57–66.
57. Sonnenschein, K., Groot, H. de und Kirsch, M. (2004):
Formation of S-Nitrosothiols from Regiospecific Reaction of Thiols with N-Nitrosotryptophan Derivatives.
J. Biol. Chem., 279 (44), 45433–45440.
58. Speit, G., Wick, C. und Wolf, M. (1980):
Induction of sister chromatid exchanges by hydroxylamine, hydrazine and isoniazid
and their inhibition by cysteine.
Hum. Genet., 54 (2), 155–158.
59. Stamler, J.S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D.I., Keaney, J., Vita, J., Singel, D.,
Valeri, C.R. und Loscalzo, J. (1992):
Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of
serum albumin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89 (16), 7674–7677.
60. Stamler, J.S., Lamas, S. und Fang, F.C. (2001a):
Nitrosylation: The Prototypic Redox-Based Signaling Mechanism.
Cell, 106 (6), 675–683.

61. Stamler, J.S., Lamas, S. und Fang, F.C. (2001b):
Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. Supplemental Material; <http://www.cell.com/supplemental/S0092-8674%2801%2900495-0>
62. Stamler, J.S., Simon, D.I., Jaraki, O., Osborne, J.A., Francis, S., Mullins, M., Singel, D. und Loscalzo, J. (1992):
S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89 (17), 8087–8091.
63. Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J. und Loscalzo, J. (1992):
S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89 (1), 444–448.
64. Szaciłowski, K. und Stasicka, Z. (2001):
S-Nitrosothiols: Materials, Reactivity and Mechanisms.
Prog. React. Kinet. Mec., 26, 1–58.
65. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Radi, R. und Alvarez, B. (2009):
Sulfenic acid--A key intermediate in albumin thiol oxidation.
J. Chromatogr. B, 877 (28), 3384–3392.
66. Wang, X., Kettenhofen, N.J., Shiva, S., Hogg, N. und Gladwin, M.T. (2008):
Copper dependence of the biotin switch assay: Modified assay for measuring cellular and blood nitrosated proteins.
Free Radical Biol. Med., 44 (7), 1362–1372.
67. Williams, D.L.. (2004):
Nitrosation Reactions And The Chemistry Of Nitric Oxide.
Amsterdam: Elsevier.
68. Winterbourn, C.C. und Metodiewa, D. (1999):
Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide.
Free Radical Biol. Med., 27 (3-4), 322–328.
69. Wright, S.K. und Viola, R.E. (1998):
Evaluation of methods for the quantitation of cysteines in proteins.
Anal. Biochem., 265 (1), 8–14.
70. Xian, M., Chen, X., Liu, Z., Wang, K. und Wang, P.G. (2000):
Inhibition of papain by S-nitrosothiols. Formation of mixed disulfides.
J. Biol. Chem., 275 (27), 20467–20473.

71. Yang, B.K., Vivas, E.X., Reiter, C.D. und Gladwin, M.T. (2003):
Methodologies for the sensitive and specific measurement of S-nitrosothiols, iron-nitrosyls, and nitrite in biological samples.
Free Radical Res., 37 (1), 1–10.
72. Ying, J., Clavreul, N., Sethuraman, M., Adachi, T. und Cohen, R.A. (2007):
Thiol oxidation in signaling and response to stress: detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications.
Free Radic Biol Med, 43 (8), 1099–1108.
73. Zhang, Y. und Hogg, N. (2005):
S-Nitrosothiols: cellular formation and transport.
Free Radical Biol. Med., 38 (7), 831–838.
74. Zhang, Y., Keszler, A., Broniowska, K.A. und Hogg, N. (2005):
Characterization and application of the biotin-switch assay for the identification of S-nitrosated proteins.
Free Radical Biol. Med., 38 (7), 874–881.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AlbSNO	S-Nitroso-Albumin
BSA	Bovines (Rinder-) Serumalbumin
BST	Biotin Switch Technique
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure), auch Ellmans Reagenz
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GSH	Glutathion, auch γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
MMH	(Mono)methylhydrazin
MMST	S-Methylmethanthiosulfonat
NANT	N-Acetyl-N-Nitrosotryptophan
NEM	N-Ethylmaleimid
NO•	Stickstoffmonoxid
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin
-SH	Thiolgruppe
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethanolamin
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen Personen, die mich im Laufe meiner Zeit als Doktorand des Instituts für Physiologische Chemie gefördert und unterstützt haben.

Insbesondere danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Kirsch, für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Mein Dank gilt Frau Angela Wensing für die geduldige Einführung in die Techniken der Laborarbeit und häufig geleistete Hilfe und Unterstützung, Herrn Prof. Dr. Dr. de Groot, Herrn PD Dr. Frank Petrat, Frau Dr. Uta Kerkweg, und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie. Ebenso bedanke ich mich bei Frau PD Dr. Utta Berchner-Pfannschmidt und den Mitarbeitern ihres Labors für ihre Unterstützung insbesondere bei der Durchführung der Western Blots.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Mithilfe und ihre moralische Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten